

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE25.02.03  
#2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 2月25日

REC'D 24 APR 2003

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-048675

[ST.10/C]:

[JP2002-048675]

出願人

Applicant(s):

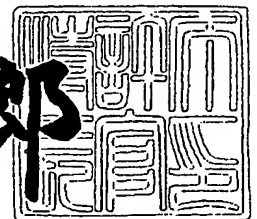
王子製紙株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3022353

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0057

【提出日】 平成14年 2月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 セロビオースデヒドロゲナーゼ

【請求項の数】 22

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区東雲一丁目10番6号 王子製紙株式会社  
                        東雲研究センター内

    【氏名】 仲亀 誠司

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区東雲一丁目10番6号 王子製紙株式会社  
                        東雲研究センター内

    【氏名】 古城 敦

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区東雲一丁目10番6号 王子製紙株式会社  
                        東雲研究センター内

    【氏名】 塚本 晃

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区東雲一丁目10番6号 王子製紙株式会社  
                        東雲研究センター内

    【氏名】 杉浦 純

【特許出願人】

    【識別番号】 000122298

    【氏名又は名称】 王子製紙株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100112346

【弁理士】

【氏名又は名称】 内藤 由美

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等の委託研究成果に係る特許出願（平成13年度「エネルギー使用合理化技術開発 エネルギー使用合理化生物触媒等技術開発 要素技術の研究開発 微生物処理を用いたパルプ製造工程の省エネルギー化技術の研究開発」）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406574

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 セロビオースデヒドロゲナーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の理化学的性質を有するセロビオースデヒドロゲナーゼ

- ① 作用：セロビオースを酸化してセロビオノラクトンを生成する。
- ② 基質特異性：セロビオース、セロオリゴ糖の他、セルロースを含有するアビセル、広葉樹クラフトパルプに作用する。
- ③ 至適 pH 及び安定 pH 範囲：反応の至適 pH 範囲は pH 2 ～ 6 であり、安定 pH 範囲は 2 ～ 5 である。
- ④ 作用適温の範囲：20 ～ 40℃ の範囲にある。
- ⑤ 熱安定性：40℃、30 分の処理で約 80 % 以上の酵素活性を保持し、50℃、30 分の処理でも約 30 % 以上の残存活性を示す。
- ⑥ 等電点：4.2 付近である。
- ⑦ 分子量：SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で測定した結果、約 91,700 である。
- ⑧ 阻害：アジ化ナトリウム、EDTA により弱く阻害を受け、 $Hg^{2+}$ 、SDS により強く阻害される。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼを生産するコリオラス・ヒルスタスを培地に培養し、得られる培養物からセロビオースデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするセロビオースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 3】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を実質的にコードする塩基配列を含むセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項 4】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を実質的にコードする塩基配列を含むセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項 5】 塩基配列が配列番号 3 である、請求項 3 に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項 6】 塩基配列が配列番号 4 である、請求項 4 に記載のセロビオース

スデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項 7】 配列番号 3 で表される塩基配列のうちの第 1 2 9 番目～第 3 2 7 4 番目の塩基を含んでなる、請求項 5 に記載のセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項 8】 配列番号 4 で表される塩基配列のうちの第 1 5 9 番目～第 3 3 2 5 番目の塩基を含んでなる、請求項 6 に記載のセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項 9】 請求項 3 ～ 8 のいずれかに記載の遺伝子と、プロモーター活性を有する DNA 断片とを含み、該遺伝子が転写可能なように該 DNA 断片に結合されている、組換え DNA。

【請求項 1 0】 請求項 3 ～ 8 のいずれかに記載のセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子、又は、請求項 9 に記載の組換え DNA を含むベクター。

【請求項 1 1】 請求項 1 0 に記載のベクターによって形質転換されたセロピオースデヒドロゲナーゼ産生宿主細胞。

【請求項 1 2】 コリオラス・ヒルスタスである、請求項 1 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 3】 請求項 1 1 又は 1 2 に記載の宿主細胞を培養し、生成したセロピオースデヒドロゲナーゼを回収することを含む、セロピオースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 1 4】 請求項 3 ～ 8 のいずれかに記載のセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンス DNA 又はアンチセンス RNA。

【請求項 1 5】 請求項 1 4 に記載のアンチセンス RNA をコードする DNA と、プロモーター活性を有する DNA 断片とを含み、該 DNA が、転写によりセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンス RNA が生成するように該 DNA 断片に結合されている、組換え DNA。

【請求項 1 6】 請求項 1 4 に記載のアンチセンス RNA をコードする DNA、又は、請求項 1 5 に記載の組換え DNA を含むベクター。

【請求項 1 7】 請求項 1 6 に記載のベクターによって形質転換されたセロ

ピオースデヒドロゲナーゼ活性抑制宿主細胞。

【請求項 1 8】 コリオラス・ヒルスタスである、請求項 1 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 9】 請求項 1 7 又は 1 8 に記載の宿主細胞を用いて木材チップを処理する方法。

【請求項 2 0】 請求項 1 9 に記載の方法によって得られる木材チップ。

【請求項 2 1】 請求項 2 0 に記載の木材チップを用いたパルプの製造法。

【請求項 2 2】 請求項 2 1 に記載の方法によって得られるパルプ。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なセロピオースデヒドロゲナーゼ、該酵素をコードする遺伝子、該酵素を生産する微生物、該酵素の製造方法、並びに、該遺伝子のアンチセンス DNA 又は RNA を利用した該遺伝子の発現を制御する方法及びその用途に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

紙パルプ工業で製造されているパルプは、その製造方法により機械パルプと化学パルプに分けられる。

機械パルプは機械的エネルギーを用いて木材繊維を物理的に摩砕して製造する。木材成分をほとんどそのまま含んでいるため、高い収率で製造することができ、薄く不透明度の高い紙を作ることができる。しかしながら、摩砕のために大きな電力を必要とすると共に、紙力強度が出にくいという欠点がある。

【0 0 0 3】

前記のような問題を解決し、かつパルプ収率を低下させない微生物のスクリーニングが広く行われている。例えば、ハンノキの一次解繊サーモメカニカルパルプ (TMP) を担子菌であるファネロケエテ・クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) によりグルコース存在下で処理した後、二次解繊を行った場合、25 から 30 % 解繊エネルギーが減少したという報告がある (Bar-Lev and T.K

.Kirk,Tappi J.,65,111,1982)。また、ファネロケエテ・クリソスポリウムとディコミタス・スクアレンス(Dichomitus squalens)を用い、アスペン材を処理した際には、コントロールと比べて紙力強度が増加している(Myers.,Tappi J.,105,1988)。Akamathuらは、コリオラス・ヒルスタス(Coriolus hirsutus)を含む白色腐朽菌10株を用いポプラ材上に培養し、パルプ収率、解繊エネルギー、パルプ強度について調べている。その結果、コリオラス・ヒルスタスでは解繊エネルギーが減少し、結晶化度が増加するなど、用いた菌株の中ではチップの前処理菌として好ましいことが示されたが、同時に収率が約7%減少している(Akamathu et al.,Mokuzai gakkai,30(8)697-702,1984)。また、Nishibeらは、白色腐朽菌61種、85株から予備選抜した10種類の腐朽菌を使って、サウグルミ木片と針葉樹2次離解TMPを微生物分解し、選択的に脱リグニンを行い、パルプ繊維の崩壊が少ないコプリナス・シネレウス(Coprinus cenereus)、ファネロケエテ・クリソスポリウムを選抜し、グルコースと尿素の存在下では紙力強度の低下が抑えられることを示した。しかし、パルプ収率の低下が、14日間、30℃の処理でそれぞれ6.3%、9.7%であった。コリオラス・ヒルスタスを用いた場合、収率減は7.5%であった(Nishibe et al.,Japan Tappi,42(2),1988)。Kashinoらは、白色腐朽菌IZU-154を自然界からスクリーニングし、ファネロケエテ・クリソスポリウムやトラメタス・ベルシカラ(Trametes versicolor)より選択的にリグニンを分解し、広葉樹を7日間処理した場合、解繊エネルギーが1/2~2/3減少することを確認した。また、パルプ強度は約2倍増加した。針葉樹を10~14日間処理した場合では解繊エネルギーが1/3減少し、強度増加も得られた。培地を加えた場合には7日間で同等の結果を得ることができた(Kashino et al.,Tappi J.,76(12),167,1993)。さらに、米国では最近、USDA Forest Products Laboratoryのグループを中心に研究機関、紙パルプ産業数社から成るリグニンコンソーシアムを形成し、リグニン分解力が高く、セルロース分解力の低い菌株のスクリーニングを行い、セリポリオプシス・サブバーミスポラ(Ceriporiopsis subvermispora)を自然界から新たに単離した。この株を用いて機械パルプの動力削減を検討し、例えば、TMPの製造エネルギーの40%近くを削減でき、このときの収率の低下が3~5%程度であり、心配される紙の強度

への悪影響はなく、むしろ強度が上がっていると報告している。USDA Forest Products Laboratoryでは既にパイロットプラントを建設し、単離したセリポリオプシス・サブバーミスポラの実証試験を行っているが、米国内の工場を想定し、工場のチップヤードで微生物処理を行うことを考えている(Scott et al., Tappi J., 81.12.153, 1998)。しかし、チップを保存しているパイル内部が高温となるため、高温で効果の得られる菌株が必要とされているが、この単離したセリポリオプシス・サブバーミスポラは32℃までの温度でしか効果が得られず、実用面での使用には不適切である。

## 【0004】

また、これまでスクリーニングで得られてきた微生物はリグニン分解の選択性が必ずしも高くなく、リグニンのみでなく、セルロースも分解されてしまうため、パルプ収率や紙力低下を生じる。従って、リグニン分解の選択性を高めた微生物、すなわち、リグニン分解能力には優れるが、セルロース分解は抑制する微生物の取得・作製がさらに求められている。

## 【0005】

リグニン分解の選択性を高めた変異体はAnderらにより作製されている。彼らは、UV照射によりスポロトリチュム・プルベルレンタム(Sporotrichum pulverulentum)に変異処理を行い、セルラーゼ活性が弱い株であるCel44の菌株の開発している。野生株とこのセルラーゼ欠損株Cel44とを用いてカバ材木片の分解を行ったところ、前者がリグニン及びキシランをよく分解するのに対し、後者はリグニン及びキシランをよく分解するが、グルカンをほとんど分解しなかった(Ander and Eriksson, Svensk Papperstidning, 18, 643, 1975)。このCel44を用いてバーチ材を6週間処理した後、機械パルプの製造を行ったところ、紙力強度の増加が見られた(Ander and Eriksson, Svensk Papperstidning, 18, 641, 1975)。また、バーチ材とパイン材を用いて実験を行い、処理時間を増加させることによって、繊維のフィブリル化とリファイニングのエネルギーが30%減少したと報告している(Eriksson and Vallander., Svensk Papperstid, 85, R33, 1982)。彼らはフィレピア・ラヂアータ(Phlebia radiata)においても同様にセルラーゼ活性の弱い株Cel26を作製した。このCel26でパイン材のチップとパルプを処理した後、機械



パルプを製造した際、いずれの場合も紙力の改善は見られなかったものの、解繊エネルギーの低下が見られた。また、重量減少は2%以下であった(Samuelsson et al., Svensk Papperstid, 8, 221, 1980)。

#### 【0006】

上記のようにセルラーゼ活性の弱い変異株の作製が行われ、機械パルプ処理への利用の検討が行われているが、これらの変異株は紫外線照射により変異処理しているため、変異株の成長速度が遅く、分解処理に長時間かかってしまうという問題がある。このため、成長速度には影響せずセルロース分解活性のみを抑える変異株の作製が望まれている。

#### 【0007】

一方、化学パルプは、化学薬品を用いて木材中のリグニンを溶出させセルロース、ヘミセルロースを取り出す製造方法である。現在では水酸化ナトリウムと硫化ナトリウムを用いて脱リグニンをを行うクラフトパルプが主流となっている。クラフトパルプにおいても機械パルプと同様に微生物処理を行い、蒸解前に脱リグニンを行うことでの製造エネルギーの削減、パルプ品質の向上が試みられている。

#### 【0008】

例えばファネロケエテ・クリソスポリウムを用いて、レッドオーク材やアスペン材を30日間処理すると、同一Ka値における収率が向上し、叩解エネルギーが削減すること、また、引張り強度と破裂強度が増加するという報告がある(Orian et al., Tappi, 73, 147, 1990)。同じく、ファネロケエテ・クリソスポリウムを用いた実験において、破裂強度、引裂き強度の増加が報告されている(Chen et al., Wood Fiber Sci., 27, 198, 1995)。Molinaらはラジアータパインをトラメタス・ベルシコラとフルオロータス・オストリータス(Pleurotus ostreatus)で処理した際には、11~14%の製造エネルギーが削減できると報告している。しかしながら、トラメタス・ベルシコラの場合にはパルプ強度の減少が見られる(Molina, 50th Appita Annual General Conference, pp. 57-63, 1996; Molina, 51th Annual General Conference, pp. 199-206)。Bajpaiらは、セリポリオプシス・サブバーミスポラを用いた実験において活性アルカリを18%削減し、蒸解時

間を33%削減し、白液中の硫化度を30%削減することができることを報告している(P.Bajpai et al., J. Pulp and Paper Science: 27(7), 235-239, 2001)。

#### 【0009】

上記のように、クラフトパルプにおける微生物処理は蒸解性を向上させエネルギーの削減をもたらすが、収率や紙力強度を低下させる場合があり、機械パルプと同様に微生物処理を実用化するには、リグニンを分解する能力には優れるが、セルロースを分解する能力は抑制されている、リグニン分解の選択性を高めた微生物の取得・作製が必要となっている。

#### 【0010】

セルロースを分解する酵素の中で、セルラーゼと総称される酵素は $\beta$ -1, 4-グルカン(セルロース)又はその誘導体の $\beta$ -1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解する酵素であり、高等植物、菌類、細菌などの微生物、軟体動物などに広く分布している。セルラーゼは、セルロース主鎖の $\beta$ -1, 4-グルコピラノシル結合をエンド型に加水分解する、いわゆるエンドグルカナーゼ(CMCアーゼ)と、セルロース主鎖のうち末端から主にセロビオース残基を切り取る、いわゆるエキソグルカナーゼ(アビセラーゼ)とに大別されることが知られている。そして、これらの加水分解酵素がセルロースに相乗的に作用することによりセルロース基質が低分子化してセロビオースを生じ、さらに $\beta$ -グルコシダーゼが関与することにより、グルコース単位まで分解される。

#### 【0011】

また、セロビオースデヒドロゲナーゼ(以下、CDHと称する)は、セロビオースやセロオリゴ糖を酸化してセロピオノラクトンを生成すると同時にキノン、鉄などの金属、フェノキシラジカル、酸素などを還元する酸化還元酵素である。この酵素は、微生物がセルロースを分解するときにセルラーゼと同時に産生される(Eriksson et al., FEBS Lett., 49, 282-285, 1974)こと、セロビオースによるセルラーゼ活性の阻害、すなわち生成物阻害を解除する(Igarashi et al., Eur. J. Biochem., 253, 101, 1998)ことから、セルラーゼとの共役でセルロース分解を促進すると考えられている。また、CDHは強力にセルロースを分解するハイドロキシラジカルを発生するFenton反応を引き起こすため、セルロース分解に

深く関与していると考えられている。このことはDumonceauxらによるCDH活性を抑制した変異株の作製ならびにその諸性質の検討結果によっても示唆されている。彼らは、抗生物質であるフェロマイシンを指標にした相同組換え法によるCDH欠損株の作製を行い、CDH欠損株では非晶性セルロースを炭素源とした場合には野生株と成長速度が変わらないが、結晶性セルロース上で培養した際には生育速度が著しく遅くなること、CDH欠損株においても広葉樹未漂白パルプのリグニンや合成リグニンである<sup>14</sup>C-DHPを野生株と同等に分解することを報告している(Dumonceaux, Enzyme and Microb. 29, 478-489, 2001)。

## 【0012】

CDHの総説 (G. Henriksson et al., J. Biotechnol. 78(2000) 93-113) 等によれば、CDHを生産する微生物としてはファネロケエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、トラメタス・ベルシカラ (*Trametes versicolor*)、スキゾフィラム・コミユネ (*Schizophyllum commune*)、コネオフォラ・プテアナ (*Coneophora puteana*)、ミセリオプトレ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、フミコーラ・インソレンス (*Fusicola insolens*) 等の木材腐朽菌が挙げられている。

## 【0013】

また、CDHをコードする遺伝子（以下、c d h遺伝子と称する）については、例えば、ファネロケエテ・クリソスポリウムでは、K3株のcDNA (Raices et al., FEBS Letters, 369, 233-238, 1995)、OGC101株ではcDNA (Li et al., Appl. Environ. Microbiol., 62(4), 1329-1335, 1996)、染色体遺伝子のクローニングが行われている (Li et al., Appl. Environ. Microbiol., 63(2), 796-799, 1997)。また、トラメタス・ベルシカラ (T.J. Dumonceaux et al., Gene, 210, 211-219, 1998) や、ピクノポラス・シンナバリナス (S.M. Moukha et al., Gene, 234, 23-33, 1999) においてもc d h遺伝子が報告されている。

## 【0014】

しかしながら、上記のようにCDHやそれをコードする遺伝子の開示はあるが、機械パルプや化学パルプ製造における微生物処理にあたって、リグニン分解の選択性を高めた微生物の取得・作製に必要なコリオラス・ヒルスタス由来のCD

Hやc d h遺伝子の解明や該遺伝子を用いた遺伝子組換え技術は報告されていない。また、そのような技術によって得られる形質転換体を用いての効果的なパルプ処理方法についても開示はされていない。

【0015】

一方、セルロース分解酵素の利用に対して、以前から強い関心が持たれている。例えば、家庭用洗剤への添加、繊維などのセルロース系高分子材料の表面処理による改質、古紙からの脱インク処理、食品の加工処理など、極めて多方面での利用が検討されてきている。このため、セルロース分解酵素を高生産する方法が求められており、CDHの高生産に関する試みとしては、ファネロケエテ・クリソスポリウムのc d h-1遺伝子上流に構成的に働くプロモーターであるD-グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼを連結させた報告がある(Li., Biochem. Biophys. Res. Commun., 270, 141-146, 2000)。しかしながら、ファネロケエテ・クリソスポリウムは日本では有害菌に指定されているため利用することはできない。従って、有害でない微生物を用いたCDHを高生産し得る技術の開発が求められているが、これまで、コリオラス・ヒルスタス由来のCDHをコードする遺伝子を用いたそのような技術の報告はなされていない。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明は、新規なセロピオースデヒドロゲナーゼ、該酵素をコードする遺伝子、該酵素を生産する微生物、該酵素の製造方法、並びに、該遺伝子のアンチセンスDNA又はRNAを利用した該遺伝子の発現を制御する方法及びその用途を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決しようとする手段】

本発明者らは上記課題を解決するために、CDH生産菌を求め、広範なスクリーニングを行い鋭意研究を行った結果、コリオラス・ヒルスタスがCDHを生産することを見い出した。更に、CDHをコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。また、該遺伝子のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを利用した該遺伝子の発現を制御する方法を開発し、該方法を用いて木材チップで

パルプを製造した際、収率や紙力強度低下を抑制することに成功し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 8 】

すなわち、本発明は以下を提供する。

(1) 以下の理化学的性質を有するセロビオースデヒドロゲナーゼ。

- ① 作用：セロビオースを酸化してセロビオノラクトンを生成する。
- ② 基質特異性：セロビオース、セロオリゴ糖の他、セルロースを含有するアビセル、広葉樹クラフトパルプに作用する。
- ③ 至適 pH 及び安定 pH 範囲：反応の至適 pH 範囲は pH 2 ～ 6 であり、安定 pH 範囲は 2 ～ 5 である。
- ④ 作用適温の範囲：20 ～ 40℃ の範囲にある。
- ⑤ 熱安定性：40℃、30 分の処理で約 80 % 以上の酵素活性を保持し、50℃、30 分の処理でも約 30 % 以上の残存活性を示す。
- ⑥ 等電点：4.2 付近である。
- ⑦ 分子量：SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で測定した結果、約 91,700 である。
- ⑧ 阻害：アジ化ナトリウム、EDTA により弱く阻害を受け、 $Hg^{2+}$ 、SDS により強く阻害される。

【 0 0 1 9 】

(2) (1) に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼを生産するコリオラス・ヒルスタスを培地に培養し、得られる培養物からセロビオースデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするセロビオースデヒドロゲナーゼの製造方法。

(3) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を実質的にコードする塩基配列を含むセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

(4) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を実質的にコードする塩基配列を含むセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

(5) 塩基配列が配列番号 3 である、(3) に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【 0 0 2 0 】

(6) 塩基配列が配列番号4である、(4)に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

(7) 配列番号3で表される塩基配列のうちの第129番目～第3274番目の塩基を含んでなる、(5)に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

(8) 配列番号4で表される塩基配列のうちの第159番目～第3325番目の塩基を含んでなる、(6)に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

(9) (3)～(8)のいずれかに記載の遺伝子と、プロモーター活性を有するDNA断片とを含み、該遺伝子が転写可能なように該DNA断片に結合されている、組換えDNA。

【0021】

(10) (3)～(8)のいずれかに記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子、又は、(9)に記載の組換えDNAを含むベクター。

(11) (10)に記載のベクターによって形質転換されたセロビオースデヒドロゲナーゼ産生宿主細胞。

(12) コリオラス・ヒルスタスである、(11)に記載の宿主細胞。

(13) (11)又は(12)に記載の宿主細胞を培養し、生成したセロビオースデヒドロゲナーゼを回収することを含む、セロビオースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【0022】

(14) (3)～(8)のいずれかに記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンスDNA又はアンチセンスRNA。

(15) (14)に記載のアンチセンスRNAをコードするDNAと、プロモーター活性を有するDNA断片とを含み、該DNAが、転写によりセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように該DNA断片に結合されている、組換えDNA。

(16) (14)に記載のアンチセンスRNAをコードするDNA、又は、(15)に記載の組換えDNAを含むベクター。

【0023】

(17) (16)に記載のベクターによって形質転換されたセロビオースデヒドロゲナーゼ活性抑制宿主細胞。

(18) コリオラス・ヒルスタスである、(17)に記載の宿主細胞。

(19) (17)又は(18)に記載の宿主細胞を用いて木材チップを処理する方法。

(20) (19)に記載の方法によって得られる木材チップ。

(21) (20)に記載の木材チップを用いたパルプの製造法。

(22) (21)に記載の方法によって得られるパルプ。

【0024】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、第1の態様において、以下の理化学的性質を有するセロビオースデヒドロゲナーゼを提供する。

【0025】

#### ①作用

Method in Enzymology(Wood et al, Vol160, Academic press, INC.California)に記載の方法により、CDH活性を測定した。すなわち、ジクロロフェノールインドフェノール(シグマ社製)、セロビオース(関東化学株式会社製)を、それぞれ0.33mM、0.67mMとなるように溶解した pH5、50mMの酢酸緩衝液にCDHを添加し、37℃にて反応させた。反応開始後、ジクロロフェノールインドフェノールの極大吸収波長550nmにおける吸光度(光路長1cm)を連続的に測定したところ、図1に示すような結果を得た。

【0026】

図1に示されるようにCDHの還元反応によりジクロロフェノールインドフェノールの減少が観察された。反応系からセロビオース、CDHのいずれかが欠如してもジクロロインドフェノールの減少が観察されないこと、ジクロロインドフェノールの代替品としてシトクロムCやMn(III)マロン酸錯体を用いても同様に還元反応が観察されることから、本酵素はCDHであることは明らかである。

【0027】

## ②力価の測定方法

C D H 活性測定は次のように行った。0.67mMジクロロフェノールインドフェノール（シグマ社製）、3.33mMセロピオース（関東化学株式会社製）、pH 5、250 mMの酢酸緩衝液をそれぞれ250ul、100ul、100ulを混合した溶液に被検液50ulを添加し、37℃にて反応させた。反応開始後、ジクロロフェノールインドフェノールの極大吸収波長550nm（モル吸光係数3965L/mol/cm）における吸光度（光路長1cm）を連続的に測定した。C D Hの活性単位については上記の条件で1分間に1umolのジクロロフェノールエンドフェノールを減少させる酵素量を1unit（ユニット：U）とした。

【 0 0 2 8 】

## ③基質特異性

セロピオース、セロオリゴ糖の他、セルロースを含有するアビセル、広葉樹クラフトパルプに作用する。

## ④至適pH及び安定pH範囲

反応至適pH及びpH安定性を、グリシン-HCl緩衝液（pH 2～4）、酢酸緩衝液（pH 4～6）、リン酸緩衝液（pH 6～8）を用いて測定した。それぞれのpHで酵素活性を測定した。結果を図2に示す。

図2により、酵素反応の至適pHは4～6であった。また、それぞれ50mMの所定緩衝液中に4℃で24時間保持した後に酵素活性を測定した。結果を図3に示す。本酵素はpH 2～5で安定であった。

【 0 0 2 9 】

## ⑤作用適温の範囲

反応温度を変えて各酵素の酵素活性を測定した。結果を図4に示す。本酵素は20～40℃において高い活性を示した。また、所定の温度で50mM酢酸緩衝液（pH 5）中に各酵素を30分放置した後に酵素活性を測定した。結果を図5に示す。

図5より40℃、30分の処理で約80%以上の酵素活性を保持し、50℃、30分の処理でも約30%以上の残存活性を示す。

【 0 0 3 0 】



## ⑥等電点

SERVA社製PRECOAT pH3～10による等電点電気泳動を行った結果、等電点は4.2であった。

## ⑦分子量

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定し、約91,700であった。

【0031】

## ⑧金属イオン、阻害剤の影響

種々の金属塩、阻害剤など種々の物質を1mMになるように酵素液に添加して、4℃で一晩保持した後、反応液中にも同種の金属塩を1mMになるように添加して酵素活性を測定した。結果を表1に示す。表1よりアジ化ナトリウム、EDTAにより弱く阻害を受け、 $Hg^{2+}$ 、SDSにより強く阻害された。

【0032】

【表1】

金属塩(1mM)	相対活性(%)
なし	100
FeSO <sub>4</sub>	0
ZnSO <sub>4</sub>	72
CuSO <sub>4</sub>	82
BaCl <sub>2</sub>	71
MgCl <sub>2</sub>	64
CaCl <sub>2</sub>	65
CoCl <sub>2</sub>	53
MnCl <sub>2</sub>	35
AlCl <sub>3</sub>	23
HgCl <sub>2</sub>	0
NiCl <sub>2</sub>	60
LiCl <sub>2</sub>	45
ZnCl <sub>2</sub>	32
CuCl <sub>2</sub>	53
NaN <sub>3</sub>	46
EDTA	45
SDS	0

## 【 0 0 3 3 】

これに対し、従来公知のCDHとしては以下の報告がある。

Henrikssonらはファネロケエテ・クリソスポリウム由来の反応至適pHが5.0、等電点が4.2付近、分子量が89,000であるCDHを報告しているが (Eur. J. Biochem., 196(1991) 101-106)、該CDHの反応至適温度は50℃である。

Royらはトラメテス・ベルシコラ由来の反応至適pHが5.0、等電点が4.2付近、分子量が97,000であるCDHを報告しているが (Appl. Environ. Microbiol., 62(1996) 4417-4427)、該CDHの反応至適温度は50℃である。

## 【 0 0 3 4 】

Fangらはスキゾフィラム・コミュネ由来のCDHを報告しているが (Arch. Biochem. Biophys., 353-1(1998) 37-46)、該CDHの反応至適pHは4.5、分子量は102,000であり、至適温度、等電点の記載はない。

Schmidhalter、Canevasciniらはコネオフォラ・プテアナ由来の等電点が3.9付近であるCDHを報告しているが (Arch. Biochem. Biophys., 300-2(1993) 559-563)、該CDHの反応至適pHは4.0、分子量は111,000であり、反応至適温度の記載はない。

## 【 0 0 3 5 】

Canevasciniらはミセリオプトレ・サーモフィラ由来の等電点が4.1付近、分子量が91,000であるCDHを報告しているが (Eur. J. Biochem., 198(1991) 43-52)、該CDHの反応至適pHは7.0であり、反応至適温度の記載はない。

Shouらはフミコーラ・インソレンス由来の等電点が4.0付近、分子量が92,000であるCDHを報告しているが (Biochem. J., 330(1991) 565-571)、該CDHの反応至適pHは7.0、反応至適温度65℃である。

本発明のCDHと上記の公知のCDHについて至適温度、至適pH、分子量、等電点とを比較した結果、本発明のCDHは公知のCDHとは異なることから、新規なCDHであると認定した。公知のCDHの理化学的性質を表2に示す。

## 【 0 0 3 6 】

【表 2】

	分子量(kD)	等電点	至適pH	至適温度(°C)	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	89	4.2	5.0	50	Eur. J. Biochem., 196(1991) 101-106
<i>Trametes versicolor</i>	97	4.2	5.0	50	Appl. Environ. Microbiol., 62(1996) 4417-4427
<i>Schizophyllum commune</i>	102	記載無し	4.5	記載無し	Arch. Biochem. Biophys., 353-1(1998) 37-46
<i>Conophora puteana</i>	111	3.9	4.0	記載無し	Arch. Biochem. Biophys., 300-2(1993) 559-563
<i>Myceliophthora thermophila</i>	91	4.1	7.0	記載無し	Eur. J. Biochem., 198(1991) 43-52
<i>Humicola insolens</i>	92	4.0	7.0	65	Biochem. J., 330(1991) 565-571

## 【0037】

本発明は、第2の態様において、上記のCDHの生産能を有するコリオラス・ヒルスタスを提供する。

ここで、コリオラス・ヒルスタスは担子菌の一種であり、和名をアラゲカワラタケと称する菌である。本発明に用いることができるコリオラス・ヒルスタスは、その属種に属する菌体であればいずれの菌体でも利用可能であるが、例えば、コリオラス・ヒルスタスIFO4917株を利用することができる。IFO4917株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-3）から容易に入手可能である。

## 【0038】

本発明は、第3の態様において、上記のCDHの製造方法を提供する。具体的には、CDHを生産するコリオラス・ヒルスタスを培地に培養し、得られる培養物からセロピオースデヒドロゲナーゼを採取することによるCDHの製造方法である。

## 【0039】

上記のコリオラス・ヒルスタスを培養する培地としては、該菌が増殖可能な培地であればいずれの組成の培地をも利用可能である。培地の栄養源としては、コリオラス・ヒルスタスの培養に通常用いられているものを広く用いることができる。炭素源としては同化可能なものであれば良く、グルコース、パルプ、結晶性セルロース等を使用することができる。窒素源としては利用可能な窒素化合物で

あれば良く、例えば、酵母エキス、ペプトン、各種アミノ酸、大豆、コンステイプリーカー、各種無機窒素などを用いることができる。その他、必要に応じて、各種の塩類やビタミン、ミネラル等を適宜用いることができる。

培養温度及びpHは、コリオラス・ヒルスタスが増殖可能な範囲において適宜設定可能である。例えば、培養温度は20～55℃、好ましくは25～30℃であり、pHは3～9、好ましくは4～6である。

#### 【0040】

本発明のCDHは、上記条件におけるコリオラス・ヒルスタスの培養によって培養液中に分泌生産されるので、培養後の培養物から本酵素を採取する。培養物から採取した溶液をそのままCDH粗酵素液として使用することができるが、塩析、限外濾過、凍結乾燥により、CDHを濃縮又は固体化することもできる。さらに、硫酸分画、ゲル濾過による分子量分画や各種イオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、疎水クロマトグラム、等電点分画等を行うことによって精製することができるが、これらの方法は繰り返すことも可能であり、さらに必要に応じて他の精製手段を組み合わせて用いることもできる。

#### 【0041】

本発明は、第4の態様において、コリオラス・ヒルスタス由来のc d h遺伝子を提供する。具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を実質的にコードする塩基配列を含むセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子、及び、配列番号2で表されるアミノ酸配列を実質的にコードする塩基配列を含むセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子を提供する。

#### 【0042】

ここで、「実質的にコードする」とは、コードされているアミノ酸配列からなるタンパク質が本発明のCDH活性を有する限り、又は塩基配列が本発明のCDHをコードするものである限り、アミノ酸又は塩基配列に欠失、置換又は付加等の変化があってもよいことを意味する。

本発明のc d h遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

#### 【0043】

上記のコリオラス・ヒルスタスから、Yeltonらの方法(Proc.Natl.Acad.Sci.US

A,81,1470(1984))等の通常の染色体DNAの抽出法を用いて染色体DNAを調製する。次に、得られた染色体DNAをS a u 3 A I等の適当な制限酵素で処理し、部分分解を行った後シヨ糖密度勾配超遠心法で分画して10kbp~25kbpのDNA断片を得る。同じ付着末端を生じさせる制限酵素で処理したファージDNAに、上記で得られたDNA断片を連結する。ファージDNAとしては、例えば、EMBL3(A-M,Frishauf et al.,J.Mol.Biol.170,827(1983)) $\lambda$ ファージDNAが用いられる。得られたDNA断片連結ファージについてin vitroでパッケージングを行い、染色体DNAライブラリーとする。また、サブクローニングには、常用のクローニングベクター、好ましくは大腸菌ベクター、例えば、pUC系であるpUC18(C.Yanisch-Perron,et al.,Gene,33,103(1985))等のプラスミドを用いることができる。クローニングベクターは、上記例示のものに制限されず、市販されるか、文献記載の公知のものが使用できる。

#### 【0044】

上記で得られた染色体遺伝子ライブラリーからのc d h遺伝子の単離にあたっては、精製後のコリオラス・ヒルスタスのCDHをフィシンエンドペプチダーゼを用いて完全消化し、アミノ酸シーケンスを行い、このアミノ酸配列から推定されるヌクレオチド配列に基づいて作製した合成DNAプローブを用い、ブラークハイブリダイゼーションによりc d h遺伝子を含むクローンを選択する。選択したクローンからc d h遺伝子を含むDNA断片を単離し、制限酵素地図の作成および配列決定を行う。配列決定は、上記のc d h遺伝子を含む断片を適当なクローニングベクター（例えばpUC19等のpUC系ベクター）に挿入し、Sangerらの方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,5463(1977))によって行うことができる。

#### 【0045】

上記の手順により、コリオラス・ヒルスタス由来のCDHをコードする配列番号3及び4で表される塩基配列が決定された。3420bpの塩基配列からなる配列番号3及び3480bpの塩基配列からなる配列番号4を有する遺伝子は、それぞれコリオラス・ヒルスタス由来のc d h 1遺伝子とc d h 2遺伝子と命名した7207bpと5345bpからなるc d hゲノム遺伝子の構造遺伝子であ

る。

配列番号3で表される c d h 1 遺伝子の構造遺伝子部分は、16個のエキソンと15個のイントロンに（介在配列）によって構成されている。

【0046】

具体的には、エキソン1は129～177、イントロン1は178～239、エキソン2は240～498、イントロン2は499～557、エキソン3は558～667、イントロン3は668～716、エキソン4は717～833、イントロン4は834～885、エキソン5は886～1028、イントロン5は1029～1077、エキソン6は1078～1242、イントロン6は1243～1301、エキソン7は1302～1374、イントロン7は1375～1425、エキソン8は1426～1480、イントロン8は1481～1534、エキソン9は1535～2165、イントロン9は2166～2223、エキソン10は2224～2351、イントロン10は2352～2407、エキソン11は2408～2456、イントロン11は2457～2509、エキソン12は2510～2598、イントロン12は2599～2653、エキソン13は2654～2799、イントロン13は2800～2859、エキソン14は2860～2930、イントロン14は2931～2995、エキソン15は2996～3100、イントロン15は3101～3157、エキソン16は3158～3274にそれぞれ存在している。さらにヌクレオチド番号3275～はターミネーターを含む3'非翻訳領域である。

【0047】

さらに、塩基配列の解析から、コリオラス・ヒルスタス由来の c d h 1 遺伝子は配列番号1で表されるアミノ酸配列を有し、768アミノ酸からなることがわかった。

また、配列番号4で表される c d h 2 遺伝子の構造遺伝子部分は、16個のエキソンと15個のイントロンによって構成されている。

【0048】

具体的には、エキソン1は159～207、イントロン1は208～269、エキソン2は270～528、イントロン2は529～587、エキソン3は5

88～697、イントロン3は698～746、エキソン4は747～863、イントロン4は864～915、エキソン5は916～1058、イントロン5は1059～1107、エキソン6は1108～1272、イントロン6は1273～1331、エキソン7は1332～1404、イントロン7は1405～1455、エキソン8は1456～1510、イントロン8は1511～1564、エキソン9は1565～2195、イントロン9は2196～2253、エキソン10は2254～2381、イントロン10は2382～2437、エキソン11は2438～2486、イントロン11は2487～2539、エキソン12は2540～2628、イントロン12は2629～2683、エキソン13は2684～2829、イントロン13は2830～2887、エキソン14は2888～2958、イントロン14は2959～3025、エキソン15は3026～3130、イントロン15は3131～3208、エキソン16は3209～3325、ヌクレオチド番号3326～はターミネーターを含む3'非翻訳領域である。

## 【0049】

さらに、塩基配列の解析から、コリオラス・ヒルスタス由来のc d h 2遺伝子は配列番号2で表されるアミノ酸配列を有し、768アミノ酸からなることがわかった。

また、c d h 1遺伝子では、配列番号3で表される塩基配列のうちの第129番目～第3274番目の塩基を含んでなるc d h 遺伝子が有用であり、c d h 2遺伝子では、配列番号4で表される塩基配列のうちの第159番目～第3325番目の塩基を含んでなるc d h 遺伝子が特に有用である。

## 【0050】

コリオラス・ヒルスタス由来のc d h 遺伝子のDNA断片は、上記c d h 染色体遺伝子を含むDNA断片からPCRによって得ることができる。PCRのプライマーとしては、配列番号2、4で表される塩基配列及びその相補的配列に基づく、約10～50塩基、好ましくは約15～30塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。例えば、配列番号7で表されるセンスプライマー、配列番号8で表されるアンチセンスプライマー

を使用することができる（実施例7参照）。

【0051】

なお、コリオラス・ヒルスタス由来の c d h 遺伝子配列を含むゲノムDNAを保有する大腸菌形質転換株、Escherichia coli JM109/pCHCDH1及びEscherichia coli JM109/pCHCDH2は、平成14年2月8日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-3）に寄託され、それぞれ受託番号FERM P-18701、FERM P-18702が付与されている。これらの寄託株に含まれる配列番号3又は4で表される塩基配列を有するDNAも、本発明に包含される。

【0052】

本発明は、第5の態様において、上記 c d h 遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを提供する。

ここでいう「アンチセンスDNA」、「アンチセンスRNA」とは、c d h 遺伝子の転写産物であるmRNAの全部又はその一部に対して実質的に相補的な配列を含んでなる塩基配列であって、細胞内に存在した場合に、相補的となる c d h 遺伝子のmRNAと結合し、それによって c d h 遺伝子の翻訳を阻害し、発現を抑制する配列を意味する。ここで「実質的に」とは、このアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAがmRNAと結合して二本鎖を形成し、それがmRNAのタンパク質への翻訳を阻害する限り、この配列に欠失、置換又は付加等の変化があってもよいことを意味する。該配列の長さは、本発明のいずれかの c d h 遺伝子の発現を抑制し得る長さであれば適宜設定可能であり、c d h 遺伝子の塩基配列の全部と等しい長さである必要は必ずしもなく、該配列の一部に該当する長さであってよい。また、これらの配列には、配列番号1及び2における、ヘム結合部位である80番目、128番目のアミノ酸、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）結合部位である236から241番目のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれることが好ましい。なお、アンチセンスDNA及びアンチセンスRNAの調製及び該配列を利用する方法については、当業者に公知の常法によって実施することができる。具体的には、c d h 遺伝子のアンチセンスDNA及びR



NAは、配列番号3又は4で表されるc d h遺伝子の塩基配列のエキソン部分が得られるようにPCR法を行ったり、c d h遺伝子を適当な制限酵素で切断して得ることができる。また、c d h遺伝子のcDNAからも取得可能である。さらには、このアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAは、c d h遺伝子の塩基配列情報をもとに人工的に作られた合成DNA又はRNAであっても良い。

## 【 0 0 5 3 】

このようにして得られるアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAは、細胞に直接導入し細胞内のmRNAと二本鎖を形成させて、該c d h遺伝子の発現を抑制させることができる。アンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを細胞に導入する方法としては、当業者に公知の常法、例えば、ポリエチレングリコール法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

本発明は、第6の態様において、前記のアンチセンスRNAをコードするDNAと、プロモーター活性を有するDNA断片とを含み、転写によりセロピオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように結合されている、組換えDNAを提供する。

## 【 0 0 5 4 】

ここで、「転写によりc d h遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように」とは、宿主内でプロモーターの作用下でアンチセンスRNAをコードするDNAのmRNAへの転写が生じた際に、本発明のc d h遺伝子からのmRNAに対して結合して二本鎖を形成し、該c d h遺伝子の発現を抑制させることができるアンチセンスRNAが生成されることを意味する。アンチセンスRNAが生成され得るように結合するには、プロモーター配列を有するDNA断片の下流にアンチセンスの方向（逆向き方向）にアンチセンスRNAをコードするDNAを結合し、プロモーターの作動によりmRNAに転写させればよい。得られるmRNAは、c d h遺伝子の塩基配列のアンチセンスRNAである。プロモーター遺伝子としては、プロモーターの作用を有する遺伝子であれば特に限定されることなく、あらゆる遺伝子を使用することができる。例えば、GPDプロモーター、*ras*プロモーターなどが挙げられる。これらのプロモーター遺伝子は、ジーンバンク

に登録された配列、文献記載の配列等に基づいて周知のゲノムクローニングまたはPCR法を行うことによって取得可能である。あるいは、寄託されている遺伝子については、分譲請求により入手可能なものを利用することができる。

## 【 0 0 5 5 】

プロモーター配列を含む遺伝子と c d h 遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNAは、必要に応じて制限部位の導入、平滑末端化または付着末端化後、適当なDNAリガーゼを用いて連結することができる。クローニング、連結反応、PCR等を含む組換えDNA技術は、例えば、J.Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989やShort Protocols In Molecular Biology, Third Edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.に記載されるものを利用することができる。

## 【 0 0 5 6 】

本発明は、第7の態様において、上記の c d h 遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNA又は該遺伝子の組換えDNAを含むベクターを提供する。

ベクターの種類は特に限定されないが、このベクターによって形質転換される宿主の種類に応じて選択される。ベクターとしては、原核または真核生物宿主細胞において自律複製可能または染色体中に相同組換え可能なベクターを使用することができる。プラスミド、ファージを含むウイルス、コスミドなどである。ベクターは、選択マーカー、複製開始点、ターミネーター、ポリリンカー、エンハンサー、リボゾーム結合部位などを適宜含むことができる。細菌、真菌、酵母、動物、植物などの原核および真核生物用の種々のベクターが市販されているか、あるいは、文献等に記載されており、これらを利用して本発明の c d h 遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNA又は組換えDNAをベクターに導入することができる。DNA導入は、例えば、J.Sambrookら（上記）に記載される技術を使用して実施することができる。なお、本発明の c d h 遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNA又は組換えDNAをベクターに導入するにあたっては、上述のように、転写により c d h 遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように導入する。

## 【0057】

本発明は、第8の態様において、上記ベクターによって形質転換された宿主細胞を提供する。

ここで宿主細胞は、担子菌、真菌類、酵母類を含む菌類だけではなく、他の真核細胞（動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、藻類など）や原核細胞（細菌、藍藻など）であっても、本発明の c d h 遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNAの発現においてプロモーター活性を発揮できるならば、いずれの宿主細胞も使用可能である。このうち、好ましい宿主細胞は担子菌であり、特に好ましくはコリオラス・ヒルスタスである。例えば、具体的には、後述の実施例に記載されているコリオラス・ヒルスタスのオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ活性を欠損している栄養要求性変異株OJ I-1078（受託番号 FERM BP-4210）を宿主として使用できる。

## 【0058】

形質転換法としては、塩化カルシウム／PEG法、リン酸カルシウム法、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、スフェロプラスト法、リポフェクション法、アグロバクテリウム法などを例示できるが、これらに限定されない。

本発明は、第9の態様において、CDH産生宿主細胞を培地に培養し、生成したCDHを回収することを含む、CDHの製造方法を提供する。

## 【0059】

CDHは、シグナルペプチドとの融合形態で発現・翻訳されるときには分泌形態で産生され、この場合には培地から直接単離することができるが、一方、CDHが非分泌形態で産生されるときには、細胞を分離し、超音波処理、ホモゲナイジング等の処理により細胞を破壊して抽出液を得、この抽出液からCDHを単離することができる。単離・精製は、溶媒抽出、塩析、脱塩、有機溶媒沈殿、限外濾過、イオン交換、疎水性相互作用、HPLC、ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、クロマトフォーカシングなどの方法を単独にまたは組み合わせて行うことができる。

## 【0060】

例えば、本発明の c d h 遺伝子上流に G P D プロモーター、r a s プロモーターを連結し、組換え DNA 技術により、C D H を大量に生産することができる。前記プロモーターは、コリオラス・ヒルスタス由来 G P D プロモーター遺伝子を含む大腸菌組換え体である E. c o l i J M 1 0 9 / p C H G P、コリオラス・ヒルスタス由来 r a s プロモーター遺伝子を含む大腸菌組換え体である E. c o l i D H 5  $\alpha$  / p C H R A S から調製することが可能であり、前記組換え体はそれぞれ F E R M P - 1 5 0 1 5、F E R M P - 1 7 3 5 2 として独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託されており入手可能である。

## 【0061】

本発明は、第 10 の態様において、前記 C D H 活性抑制宿主細胞を用いて木材チップを処理する方法、該方法によって得られる木材チップ、該木材チップを用いた機械パルプ又はクラフトパルプの製造法、及び、該製造法によって得られる機械パルプ又はクラフトパルプを提供する。

## 【0062】

ここで「木材チップ」とは、木材を機械的に 2~3cm の大きさに小片化したものであり、マツ、スギ、モミ、トウヒ、ダグラスファー、ラジアータパイン等の針葉樹及びブナ、カバ、ハンノキ、カエデ、ユーカリ、ポプラ、アカシア、ラワン、ゴム等の広葉樹を含む木材から得られ、パルプ等の原料として用いることができるものであればいずれの材種のチップをも用いることができる。

## 【0063】

本発明において、木材チップを C D H 活性抑制宿主細胞で処理する。C D H 活性抑制宿主細胞が十分に生育するのであれば、木材チップは前処理なくそのまま用いることができるが、他の微生物を殺菌する前処理を実施した方が C D H 活性抑制宿主細胞が生育しやすいのであれば、オートクレーブやスチーミング等を用いて殺菌の前処理を行うのが好ましい。

## 【0064】

木材チップを C D H 活性抑制宿主細胞で処理する温度は 10~60℃ が好ましく、さらに好ましくは 20~30℃ である。木材チップ中の水分は 20~80%

、好ましくは30～50%とするのが良い。木材チップへの空気供給量はCDH活性抑制宿主細胞が十分に生育可能であれば必要ないが、通常、対チップ容積1Lあたりに供給する空気量が毎分0.001～1L/(1・min)(以下、空気供給量の単位L/(1・min)をvvmと称する)とするのが良く、好ましくは、対チップ容積あたり0.01vvm～0.1vvmである。

## 【0065】

CDH活性抑制宿主細胞の木材チップへの接種量は、パルプ収率や紙力を軽減することがない限り、適宜設定することができる。

CDH活性抑制宿主細胞は、滅菌水とともに粉碎し、木材チップに対して植菌して培養することができるが、木材チップに培地を添加して処理してもよい。培地は、CDH活性抑制宿主細胞が生育できるのであればいずれの培地をも用いることができる。例えば、炭素源としては、グルコース、セロビオース、非晶性セルロース等を使用することができる。また、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、各種アミノ酸、大豆、コーンステープリカー、各種無機窒素などの窒素化合物を用いることができる。さらに、必要に応じて、各種塩類やビタミン、ミネラル等を適宜用いることができる。

## 【0066】

CDH活性抑制宿主細胞によって処理した木材チップは、サーモメカニカルパルプ(TMP)、グラウンドパルプ(GP)、リファイナードグラウンドパルプ(RGP)などの機械パルプにおいては解繊エネルギーの減少や紙力の増加が認められ、クラフトパルプやサルファイトパルプなどの化学パルプの製造においては蒸解性の向上や紙力の増加が得られる。

## 【0067】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## [測定法の概要]

CDH活性の測定は次のように行った。

## 【0068】

0.67mMジクロロフェノールインドフェノール（シグマ社製）、3.33mMセロビオース（関東化学株式会社製）、pH5、250mMの酢酸緩衝液をそれぞれ250ul、100ul、100ulを混合した溶液に被検液50ulを添加し、37℃にて反応させた。反応開始後、ジクロロフェノールインドフェノールの極大吸収波長550nm（モル吸光係数3965L/mol/cm）における吸光度（光路長1cm）を連続的に測定した。CDHの活性単位については上記の条件で1分間に1umolのジクロロフェノールインドフェノールを減少させる酵素量を1unit（ユニット：U）とした。

## 【0069】

## [実施例1] 粗酵素液の調製（1）

酸素漂白後広葉樹クラフトパルプ（カップー価8.5、白色度46.0%）1.0%、ペプトン1.0%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005%、 $KH_2PO_4$  0.15%、チアミン塩酸塩 20ppbを含む液体培地（pH5.0）100mlを500ml容三角フラスコに採り、紙栓をした後、121℃で15分間蒸気滅菌した。これにコリオラス・ヒルスタスIFO4917株を白金耳植菌し、27℃で回転振盪培養した（振幅25mm、120往復/分）。培養終了後、遠心分離（10,000rpm×10分）して培養上清を分離し、CDHの粗酵素液を得た。上記の条件で活性を測定した結果、培養上清中のCDH活性は、培養開始後72時間後で0.06 U/mlであった。

## 【0070】

## [実施例2] 粗酵素液の調製（2）

アピセル（フナコシ薬品株式会社製）1.0%、ペプトン1.0%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005%、 $KH_2PO_4$  0.15%、チアミン塩酸塩 20ppbを含む液体培地（pH5.0）100mlを500ml容三角フラスコに採り、紙栓をした後、121℃で15分間蒸気滅菌した。これにコリオラス・ヒルスタスIFO4917株を白金耳植菌し、27℃で回転振盪培養した（振幅25mm、120往復/分）。培養終了後、遠心分離（10,000rpm×10分）して培養上清を分離し、CDHの粗酵素液を得た。上記の条件で活性を測定した結果、培養上清中のCDH活性は、培養開始後72時間後で0.07 U/mlであった。

## 【0071】

## [実施例3] CDHの精製（1）

実施例 1 又は実施例 2 で得た粗酵素液を硫酸分画し、80%沈殿画分を遠心分離 (20,000rpm×10分) にて回収した後、20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解した。得られた粗酵素液について、1 M硫酸を含む20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したResource 15PHE (直径1.6×3cm、Amasham社製) を用いて疎水クロマトグラフィーを行った。

## 【 0 0 7 2 】

吸着画分を硫酸濃度 1 M～0 Mまでの濃度勾配で20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) にて溶出し、9mlずつ分画し、活性画分を得た。この画分をさらに100mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したHiLoad26/60 Superdex200 (直径2.6×60cm、Amasham社製) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。流速1.5ml/minで行い、3mlずつ分画し活性画分を得た。

## 【 0 0 7 3 】

この画分を集め、20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したPOROS HQ (直径4.6×10cm、ABI社製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着画分を 0 M～1Mまでの濃度勾配で塩化ナトリウムを含む該緩衝液にて溶出し、9mlずつ分画し活性画分を得た。

活性画分に対し、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、均一に精製されていることが確認できた。培養液に対する精製酵素の収率は4.9%、比活性は10.5U/mgであった。

## 【 0 0 7 4 】

## [実施例 4] CDHの精製 (2)

実施例 1 又は実施例 2 で得た粗酵素液を凍結・融解を行うことにより析出するグルカン状物質を遠心分離 (20,000rpm×10分) で除去した後、硫酸濃度が 1 Mになるように硫酸を添加した。得られた粗酵素液について、1 M硫酸を含む20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したResource 15PHE (直径1.6×3cm、Amasham社製) を用いて疎水クロマトグラフィーを行った。

## 【 0 0 7 5 】

吸着画分を硫酸濃度 1 M～0 Mまでの濃度勾配で20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) にて溶出し、9mlずつ分画し、活性画分を得た。この画分をさらに100mM塩化ナトリ

ウムを含む20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したHiLoad26/60 Superdex200 (直径2.6×60cm、Amasham社製) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。流速1.5ml/minで行い、3mlずつ分画し活性画分を得た。この画分を集め、20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したmonoQ HR 5/5 (直径0.5×5cm、Amasyam社製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着画分を0M~0.4Mまでの濃度勾配で塩化ナトリウムを含む該緩衝液にて溶出し、1mlずつ分画し活性画分を得た。

活性画分に対し、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、均一に精製されていることが確認できた。培養液に対する精製酵素の収率は16.6%、比活性は10.5U/mgであった。

【0076】

#### 【実施例5】 染色体DNAライブラリーの作製

コリオラス・ヒルスタスIFO4917株の平板寒天培養から直径5mmの寒天片をコルクボーラーで打ち抜き、グルコース・ペプトン培地 (グルコース2%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、リン酸でpH4.5に調製) 200mlに植菌し、28℃で7日間回転振盪培養を行った。培養後菌体を集菌し、1Lの滅菌水で菌体を洗浄した後、液体窒素で凍結した。

【0077】

この凍結菌体5gを乳鉢を用いて粉碎した。粉碎した菌体を遠心管に移し、溶菌緩衝液 (100mMトリス (pH8)、100mMEDTA、100mMNaCl、さらにプロテイナーゼKを100μg/mlとなるように添加) 10mlを加え、55℃で3時間インキュベートした。インキュベート後、フェノール処理、クロロホルム処理を行い、水層部分にエタノール徐々に添加しDNAが析出したところで染色体DNAを巻取り、TE溶液に懸濁した。

【0078】

得られた染色体DNA100μgを制限酵素Sau3AIで部分分解し、5~20%ショ糖密度勾配超遠心分離 (30,000rpm, 18時間) により分画し、20~40kbp断片区分を集めた。この断片区分を東洋紡社製ファージλ



EMBL3-BamAームにT4DNAリガーゼを用いて連結し、得られたファージDNAをSTRATAGENE社製ギガバックゴールドを用いてパッケージング後、大腸菌P2329株に感染せしめ染色体DNAライブラリーとした。

【0079】

〔実施例6〕 染色体DNAライブラリーからのc d h遺伝子の単離

上記染色体DNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーションによりc d h遺伝子を含むクローンの選抜を行った。この一連の操作は常法(Sambrookら著、Molecular Cloning A Laboratory Manual/2nd Edition(1989))によった。ブランクハイブリダイゼーションに用いたプローブは次の配列を持つ合成オリゴマーを<sup>32</sup>Pで放射能標識したものである。

5'-TA(T/C)GA(A/G)AA(T/C)AA(A/G)ATT(T/C/A)TT(T/C/A/G)-3' (配列番号5)

その結果、約40,000個のブランクの中から4個の陽性クローンを選抜することができた。陽性クローンから常法に従って調製した組換え体ファージDNAを各種制限酵素で消化し、上記の合成DNAを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、制限酵素XhoIで消化して得られた断片中に7.2kbp、5.3kbpのDNAバンドとしてプローブにハイブリダイズするそれぞれ異なるクローンが認められた。

【0080】

上記DNA断片7.2kbp、5.3kbpをアガロースゲル電気泳動法により切り出し、大腸菌ベクターpBluescriptII SK+のXhoIサイトにサブクローニング化し、プラスミドpCHCDH1及びpCHCDH2を得た。これらのプラスミドをそれぞれ大腸菌JM109株へ形質転換した。

【0081】

なお、得られたコリオラス・ヒルスダス由来c d h遺伝子を含む大腸菌形質転換株*Escherichia coli* JM109/pCHCDH1及び*Escherichia coli* JM109/pCHCDH2は、平成14年2月8日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-3)に寄託され、それぞれ受託番号FERM P-18701、FERM P-18702が付与されている。次いで、サブクローニング化したDNAを大量に調製し、超遠心操作(50,000rpm, 16h, 15℃)で精製し、塩

基配列を決定した。塩基配列の決定はUnited States Biochemical社製のシーケンシングキットを用いて行った。塩基配列を配列番号3及び4に示す。上記塩基配列範囲内において、コリオラス・ヒルスタス由来のc d h遺伝子は15個のイントロンにより分断されていた。

また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、これまで報告されているc d h遺伝子と高い類似性が認められた。アミノ酸配列を配列番号1及び2に示す。

#### 【0082】

〔実施例7〕 コリオラス・ヒルスタス由来グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターによるコリオラス・ヒルスタス由来c d h遺伝子の発現ベクターの構築

コリオラス・ヒルスタスのプロモーターの下流にc d h遺伝子の構造遺伝子領域を連結し、本来のc d h遺伝子からプロモーター領域をグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域に置換した選択マーカー遺伝子とした。

#### 【0083】

具体的には、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ染色体遺伝子をE c o R I及びB a m H Iで消化し3.8 k b pのDNA断片（断片1）を得た。ファージベクターM13mp18のE c o R I、B a m H IサイトにT4 DNAリガーゼを用いて前記断片1を連結し、これを大腸菌JM109株に形質転換し、一本鎖ファージDNAを調製した。

#### 【0084】

次に、配列番号6で表される塩基配列を有するDNAプライマーをフォスフォアミダイド法により合成し、上記一本鎖ファージDNAに対してアニーリングを行い、プライマー伸長法によりGPD遺伝子のプロモーター領域だけを合成し、制限酵素E c o R I（宝酒造社製）で切断することにより0.9 k b pのDNA断片（断片2）を調製した。

プライマー：5' -CATGATGTGTGGTGGATG- 3' （配列番号6）

#### 【0085】

一方、CDHの成熟型酵素をコードしている遺伝子領域だけを取り出すため、

実施例6で得られたプラスミドpCHCDH1を鋳型にし、配列番号7、8で表される塩基配列を有するプライマーで伸長させ、約3.5kbpのDNA断片を得た(断片3)。

プライマー：5' -ATGAAGTTCAAGAGTCTCCTGT-3' (配列番号7)

プライマー：5' -GGTACAGTACTTATCTGTAT-3' (配列番号8)

#### 【0086】

大腸菌ベクターのpUC18を制限酵素EcoRIとSmaI(宝酒造社製)で切断し、上記の断片2及び断片3のDNA断片を混合して、T4DNAリガーゼで連結した後、大腸菌JM109株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片2及び3のDNA断片が同時に挿入されているプラスミドを単離し、これをpGPCDH1と命名した。

#### 【0087】

【実施例8】 c d h遺伝子のアンチセンス遺伝子を有するプラスミドの構築

実施例7と同様の方法を用いてGPDプロモーター領域の断片1を得た。また、コリオラス・ヒルスタス由来のc d h1遺伝子を含むプラスミドpCHCDH1から、以下の配列番号9及び10に示す2つのプライマーを用いてPCR法を行い、コリオラス・ヒルスタスの9番目のエクソンを含む500bpのDNA断片(断片4)を取り出した。また、コリオラス・ヒルスタス由来のマンガンパーオキシダーゼ遺伝子を含むプラスミドpBSMPOG1(寄託番号FERMP-14933)に対して、以下の配列番号11及び12に示す2つのプロモーターを用いてPCR法を行い、マンガンパーオキシダーゼのC末側非翻訳領域の増幅を行った(断片5)。

#### 【0088】

プライマー：5' -CTTTACTGGTACCCCAACAACAATG-3' (配列番号9)

プライマー：5' -GTTGATCGACGGGTTGTGACACACG-3' (配列番号10)

プライマー：5' -GCGGCCGCGTCACCTCCGT-3' (配列番号11)

プライマー：5' -GCGGCCGCGGTACTGTG-3' (配列番号12)

#### 【0089】

大腸菌ベクターのpUC18を制限酵素EcoRIとSmaI(宝酒造社製)

で切断し、上記DNA断片2、4及び5を混合してT4DNAリガーゼで連結した後、大腸菌JM109株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片の2及び4及び5の3種類のDNA断片が同時に挿入されているプラスミドを単離し、これをpGPCDHAMと命名した。

## 【0090】

〔実施例9〕 CDHを高分泌生産するコリオラス・ヒルスタス形質転換体の作製

## a. 一核菌糸体培養

直径6mm前後のガラスビーズを約30個入れた500ml容三角フラスコにSMY培地（シュクロース1%、麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%）100mlを分注して滅菌後、コリオラス・ヒルスタスOJ1-1078株の平板寒天培地から直径5mmの寒天片をコルクボーラーで打ち抜きSMY培地に植菌し、28℃で7日間静置培養した（前培養）。ただし、菌糸を細分化するために、1日に1～2回振り混ぜた。次に、1L容の三角フラスコにSMY培地200mlを分注し、さらに回転子を入れ、滅菌後、前培養菌糸をナイロンメッシュ（孔径30μm）で濾集し、全量を植菌し、28℃で培養した。なお、スターラーで1日2時間程度攪拌することにより菌糸を細分化した。この培養を4日間行った。

## 【0091】

## b. プロトプラストの調製

上記液体培養菌糸をナイロンメッシュ（孔径30μm）で濾集し、浸透圧調節溶液（0.5M  $MgSO_4$ 、50mlマレイン酸バッファー（pH5.6））で洗浄した。次に、湿菌体100mgあたり1mlの細胞壁分解酵素液に懸濁し、緩やかに震盪しながら28℃で3時間インキュベートしてプロトプラストを遊離させた。細胞壁溶解酵素として、次の市販酵素製剤を組み合わせ使用した。即ち、セルラーゼ・オノヅカ（cellulase ONOZUKA RS）ヤクルト社製5mg、ヤタラーゼ（Yatalase）（宝酒造社製）10mgを上記浸透圧調節溶液1mgに溶解して酵素液として用いた。

## 【0092】

## c. プロトプラストの精製

上記酵素反応液からナイロンメッシュ（孔径  $30\ \mu\text{m}$ ）で菌糸断片を除いた後、プロトプラストの回収率を高めるため、ナイロンメッシュ上に残存する菌糸断片とプロトプラストを上記浸透圧調節溶液で1回洗浄した。得られたプロトプラスト懸濁液を遠心分離（ $1,000\text{ k} \times \text{g}$ 、5分間）し、上清を除去し、 $4\text{ ml}$ の $1\text{ M}$ シュウクロース（ $20\text{ mM}$  MOPS緩衝液、 $\text{pH } 6.3$ ）で再懸濁後、遠心操作を繰り返し、上記 $1\text{ M}$ シュウクロース溶液で2回洗浄した。沈殿物に $1\text{ M}$ ソルビトール溶液（ $20\text{ mM}$  MMS、 $\text{pH } 6.4$ ）に $40\text{ mM}$ 塩化カルシウムを加えた溶液 $500\ \mu\text{l}$ に懸濁し、プロトプラスト溶液とした。この溶液を $4^\circ\text{C}$ で保存した。

プロトプラスト濃度は血球計算盤を用いて、直接検鏡により求めた。すべての遠心操作はスウィングローターで $1,000 \times \text{g}$ 、5分間、室温下で行った。

【0093】

## d. 形質転換

$10^6$ 個/ $100\ \mu\text{l}$ 濃度のプロトプラスト溶液 $100\ \mu\text{l}$ に対して、実施例7で作製したプラスミドpGPCDH1を添加し、30分間氷冷した。次に、液量に対して等量のPEG溶液（ $50\%$  PEG3400、 $20\text{ mM}$  MOPS（ $\text{pH } 6.4$ ））を加え、30分間氷冷した。次に、 $0.5\text{ M}$ シュウクロースおよびロイシンを含む最少寒天培地（寒天 $1\%$ ）に混合してプレートに撒いた。上記プレートを $28^\circ\text{C}$ で数日間培養を行い、形質転換体を得た。この時の形質転換効率には $300$ コロニー/ $\mu\text{g}$ 形質転換DNAであった。なお、プラスミドベクターだけのDNA供与体を用いた対照実験では形質転換体は全く得られなかった。

【0094】

得られた形質転換体をグルコース・ペプトン培地（グルコース $30\text{ g/l}$ 、ポリペプトン $10\text{ g/l}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1.5\text{ g/l}$ 、 $\text{MgSO}_4$   $0.5\text{ g/l}$ 、塩酸チアミン $2\text{ mg/l}$ 、リン酸で $\text{pH } 4.5$ に調製）を $100\text{ ml}$ ずつ含む $300\text{ ml}$ 容三角フラスコに植菌し、 $28^\circ\text{C}$ 、 $100\text{ rpm}$ で振盪培養した。上記に示すCDH活性測定方法を用いて、CDH活性を経時的に測定した。その結果、コントロールのCDH活性は $0.02\text{ U/ml}$ であったが、形質転換体は $0$ 。

2 U / m l であつた。

【 0 0 9 5 】

〔実施例 1 0〕 C D H 活性を抑制した形質転換体の作製

実施例 9 の中で示したプラスミド p G P C D H 1 を実施例 8 で作製した p G P C D H A M に変えて形質転換を行った。酸素漂白後広葉樹クラフトパルプ ( L O K P ) ・ペプトン培地 ( L O K P 1 % 、 ポリペプトン 0 . 5 % 、 酵母エキス 0 . 2 % 、  $K H_2 P O_4$  0 . 1 5 % 、  $M g S O_4$  0 . 0 5 % 、 リン酸で p H 4 . 5 に調製) を 1 0 0 m l ずつ含む 3 0 0 m l 容三角フラスコに得られた形質転換体を植菌し、 2 8 ° C 、 1 0 0 r p m で振盪培養した。上記した C D H 活性測定方法を用いて、 C D H 活性を経時的に測定した。その結果、 C D H 活性を有しない形質転換体 ( 0 . 0 1 U / m l ) を得ることができた。

【 0 0 9 6 】

〔実施例 1 1〕 C D H 活性抑制形質転換体を用いた木材チップ処理

実施例 1 0 によって得られた C D H 活性を抑制した形質転換体をポテトデキストロース寒天培地上で 2 8 ° C にて培養した後、 4 ° C で保存した。このプレートから直径 5 m m のコルクボーラーで打ち抜いた切片を 5 つずつ、グルコース・ペプトン培地 ( グルコース 2 % 、 ポリペプトン 0 . 5 % 、 酵母エキス 0 . 2 % 、  $K H_2 P O_4$  、  $M g S O_4$  0 . 0 5 % 、 リン酸で p H 4 . 5 に調製) を 1 0 0 m l ずつ含む 3 0 0 m l 容三角フラスコに植菌し、 2 8 ° C 、 1 0 0 r p m で 1 週間振盪培養した。培養後、形質転換体をろ別し、滅菌水で洗浄し、残存していた培地を除去した。

【 0 0 9 7 】

この形質転換体を用いて木材チップを次のようにして処理した。形質転換体を滅菌水と共に、ワーリングブレンダーで 1 5 s e c 粉碎し、絶乾重量 1 k g のユーカリ材の木材チップに対し、形質転換体の乾燥重量が 1 g になるように植菌した。植菌後は形質転換体が全体に行き渡るようによく攪拌した。培養は 2 8 ° C で通気をしながら 1 週間静置培養を行った。また、木材チップ含水率が 4 0 ~ 6 5 % になるように随時飽和水蒸気を通気させた。通気する際に通気量は対チップ当り、 0 . 0 1 v v m になるように行った。

## 【 0 0 9 8 】

〔実施例 1 3〕 C D H 活性抑制形質転換体により処理した木材チップを用いた機械パルプの製造

実施例 1 2 のユーカリ材をラジアータパイン材に代えて、実施例 1 2 に準じて木材チップ処理を行った。得られた処理後の木材チップを次のようにして機械パルプの製造に用いた。ラボ用リファイナー（熊谷理機社製）を用い、前記の処理後の木材チップを叩解し、カナディアンスタンダードフリーネスを 2 0 0 m l とした。

## 【 0 0 9 9 】

得られた機械パルプについて、手抄きシートの物理試験を行い、解繊エネルギー、比引裂強さ、比破裂強さについて検討した。パルプ物理用試験用手抄きシートの調製は、T a p p i 試験法 T 2 0 5 o m - 8 1 に準拠し、パルプ手抄きシートの物理試験は、T a p p i 法 T 2 2 0 o m - 8 3 に準拠して行った。使用電力量はワットメーター（Hiokidenki model3133）と積分計（model3141）を用いた。

## 【 0 1 0 0 】

また、木材チップの劣化度合を確認するため、以下の式を用いて木材チップ収率を算出した。チップ収率の算出に用いる各重量は、水分を含んだ木材チップを容器に絶乾重量で 1 k g 分取し、実施例 1 0 によって得られた C D H 活性を抑制した形質転換体による処理前後のチップ絶乾重量を測定して求めた。

## 【 0 1 0 1 】

$$(\text{処理後の絶乾重量}) / (\text{処理前の絶乾重量}) \times 100$$

なお、比較対照として、野生株コリオラス・ヒルスタス I F O 4 9 1 7 株を形質転換体と同様に用いて処理して得られた機械パルプと、微生物による処理を行わなかった木材チップより調製した機械パルプ（コントロール）を用いた。

## 【 0 1 0 2 】

表 3 に示すように、C D H 活性抑制形質転換株は木材チップの収率の減少を抑制することができ、機械による解繊エネルギーを削減できた。また、形質転換体で処理した木材チップによる機械パルプでは、引裂強さ、破裂強さの値は共に増

加することが認められた。一方、野生株で木材チップを処理した場合には、機械による解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、引裂強さ、破裂強さの値は共に低く、紙力は低下することが明らかであった。

【0103】

【表3】

CDH活性抑制形質転換体による木材チップ処理が機械パルプに与える影響

	Control	形質転換体	野生株
チップ収率(%)	99.8	98.9	94.7
解繊エネルギー(kW・h/ton)	2560	1792	1840
比引裂強さ(mN・m <sup>2</sup> /g)	7.92	8.21	6.95
比破裂強さ(kPa・m <sup>2</sup> /g)	1.35	1.52	1.21

【0104】

【実施例14】 CDH活性抑制形質転換体により処理した木材チップを用いたクラフトパルプの製造

実施例12に準じてユーカリ材の木材チップ処理を行った後、絶乾重量400gの木材チップを測りとり、オートクレーブ内で液比5、硫化度30%、有効アルカリ17%(Na<sub>2</sub>Oとして)となるように蒸解白液を加え、蒸解温度を150℃にてクラフト蒸解を行った。クラフト蒸解終了後、黒液を分離し、得られた木材チップを高濃度離解機によって解繊後、濾布で遠心脱水と水洗浄を3回繰り返した。次いで、10カットのフラットスクリーン(熊谷理機工業(株))を用いて、未蒸解物を除き、蒸解未漂白パルプを得た。精選収率及び粕率の測定方法は、以下に示す式を用いた。

【0105】

精選収率(%) = 蒸解未漂白パルプ乾燥重量 / 蒸解に用いたチップ乾燥重量 × 100

粕率(%) = スクリーン上に残った未蒸解物重量 / 蒸解に用いたチップ乾燥重量 × 100

上記のクラフト蒸解して得られたパルプに対して、NaOHを2.0質量%添加し、酸素ガスを注入し、100℃、酸素ゲージ圧0.49MPa(5kg/c



m<sup>2</sup> ) で 6 0 分間処理を行った。

【 0 1 0 6 】

次いで、上記で得たクラフトパルプに対し、下記に示すような、D-E-P-Dの4段階漂白処理を行った。最初の二酸化塩素処理(D)は、パルプ濃度が10質量%となるように調製し、二酸化塩素を0.4質量%添加し、70℃、40分間処理を行った。次いで、イオン交換水にて洗浄、脱水後、パルプ濃度を10質量%に調製し、苛性ソーダを1質量%添加し、70℃、90分間のアルカリ抽出処理(E)を行った。次いで、イオン交換水にて洗浄、脱水後、パルプ濃度を10質量%に調製し、過酸化水素0.5質量%、苛性ソーダ0.5質量%を順次添加し、70℃、120分間の過酸化水素処理(P)を行った。次いで、イオン交換水にて洗浄、脱水後、パルプ濃度を10%に調製し、二酸化塩素0.25質量%を添加し、70℃、180分間二酸化塩素処理(D)を行った。最後に、イオン交換水にて洗浄、脱水後、JIS P 8123に準じた白色度86.0%の漂白パルプを得た。

【 0 1 0 7 】

パルプ濃度が4質量%の上記処理により得られたパルプスラリーを、リファイナーによりフリーネスが410ml(CSF)となるようにPFIミルを用いて叩解した。

得られたクラフトパルプについて、手抄きシートの物理試験を行い、比引裂強さ、比破裂強さ、裂断長、耐折強さ、PFIミルの回転動力について検討した。パルプ物理試験用手抄きシートの調製は、Tappi試験法T205om-81に準拠し、パルプ手抄きシートの物理試験はTappi法T220om-83に準拠して行った。

【 0 1 0 8 】

また、パルプ中に残存するリグニン量を測定するため、カップー価を測定した。カップー価はJIS P 8211に準じて行った。

なお、比較対照として、野生株コリオラス・ヒルスタスIFO04917株を形質転換体と同様に用いて処理して得られた機械パルプと、微生物による処理を行わない機械パルプ(コントロール)を用いた。

【0109】

結果を表4及び表5に示す。表4から明らかなように、形質転換体、野生株で木材チップを処理した場合、蒸解後のカップー価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。

また、表5から明らかなように、形質転換体と野生株とを比較すると、野生株が紙力低下を引き起こしているのに対し、形質転換体ではコントロールと同等、あるいはそれ以上の紙力強度を有し、CDH活性抑制形質転換体によって処理した木材チップがクラフトパルプの製造において非常に有用であることが確認された。

【0110】

【表4】

CDH活性抑制形質転換体を用いた木材チップ処理がクラフト蒸解性に与える影響

	Control	形質転換体	野生株
蒸解後カップー価	20.1	17.6	17.7
精選収率(%)	45.7	47.8	47.3
粕率(%)	1.20	0.65	0.84

【0111】

【表5】

CDH活性抑制形質転換体を用いた木材チップ処理がクラフトパルプの紙力強度に与える影響

白色度86、CSF（カナディアンショッパーフリーネス）＝410ml

	Control	形質転換体	野生株
PFI (rev)	2,600	2,200	2,200
比引裂強さ(mN・m <sup>2</sup> /g)	9.4	9.3	8.5
裂断長(km)	8.62	8.71	7.34
比破裂強さ(kPa・m <sup>2</sup> /g)	6.76	7.72	7.54
耐折強さ(log T)	2.31	2.35	2.19

【0112】

【発明の効果】

本発明は、新規なCDH、該酵素をコードする遺伝子、該酵素を生産する微生物

物、該酵素の製造方法、並びに、該遺伝子及び該遺伝子のアンチセンス遺伝子を含む組換えベクターで形質転換された形質転換体及びその用途を提供するものであり、該新規CDHをコードする遺伝子を用いた遺伝子組換えによる形質転換宿主細胞によってCDHの効率的な生産が可能となるとともに、該新規CDHをコードする遺伝子のアンチセンス遺伝子を用いた遺伝子組換えによるCDH活性が抑制された形質転換宿主細胞を木材チップ処理に用いることによって、収率や紙力に優れたパルプ製造法を実施することが可能となるものである。

【0113】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> OJI PAPER CO., LTD.

<120> Cellobiose dehydrogenase

<130> P02-0057

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 768

<212> PRT

<213> Coriolus hirsutus

<400> 1

Met Lys Phe Lys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Pro Leu Val Gly Ser

1

5

10

15

Val Tyr Ser Gln Val Ala Ala Pro Tyr Gln Asp Ala Gly Asn Gly Phe

20

25

30

Val Phe Asp Gly Val Thr Asp Pro Val His Ser Val Thr Tyr Gly Ile

35

40

45

Val Leu Pro Gln Ala Ala Ser Ser Ser Glu Phe Ile Gly Glu Ile Val

50

55

60

Ala Pro Asn Asp Ala Gln Trp Ile Gly Leu Ala Leu Gly Gly Ala Met

65

70

75

80

Ile Gly Asp Leu Leu Leu Val Ala Trp Pro Tyr Glu Asn Lys Ile Ile

85

90

95

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Pro Ala Val Tyr Glu

100

105

110

Gly Pro Thr Ile Thr Thr Leu Pro Ser Ser Ser Ile Asn Ser Thr His

115

120

125

Trp Lys Phe Val Phe Arg Cys Gln Asn Cys Thr Ser Trp Asp Gly Gly

130

135

140

Ser Ile Asp Pro Ser Gly Thr Gly Val Phe Ala Trp Ala Tyr Ser Asn

145

150

155

160

Val Ala Val Asp Thr Pro Ala Asp Pro Asn Ser Ser Phe Ala Glu His  
 165 170 175

Thr Asp Phe Gly Phe Phe Gly Val Asn Phe Pro Asp Ala Gln Asn Ser  
 180 185 190

Asn Tyr Gln Ser Tyr Leu Gln Gly Asn Ala Gly Thr Pro Pro Pro Thr  
 195 200 205

Ser Val Pro Ser Gly Pro Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Gly Pro Thr  
 210 215 220

Ala Thr Ala Thr Pro Phe Asp Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Pro Gly  
 225 230 235 240

Gly Leu Ile Ala Ala Asp Arg Leu Ser Glu Ala Gly Lys Lys Val Leu  
 245 250 255

Leu Leu Glu Arg Gly Gly Pro Ser Thr Ala Glu Thr Gly Gly Thr Tyr  
 260 265 270

Asp Val Pro Trp Ala Lys Ser Ala Asn Leu Thr Lys Phe Asp Val Pro  
 275 280 285

Gly Leu Phe Glu Thr Leu Phe Thr Asp Thr Asn Pro Phe Trp Trp Cys  
 290 295 300

Lys Asp Thr Asn Phe Phe Ala Gly Cys Ile Leu Gly Gly Gly Thr Thr  
 305 310 315 320

Val Asn Gly Ala Leu Tyr Trp Tyr Pro Asn Asn Asn Asp Phe Ser Thr  
 325 330 335

Ala Ser Gly Trp Pro Ser Ser Trp Thr Asn His Gln Pro Phe Thr Asn  
 340 345 350

Lys Leu Lys Gln Arg Leu Pro Ser Thr Asp His Pro Ser Thr Asp Gly  
 355 360 365

Gln Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Asn Val Val Gln Gln Leu Leu Gln  
 370 375 380

Ser Gln Gly Tyr Arg Gln Val Thr Ile Asn Asp Asp Pro Asp Ser Lys  
 385 390 395 400

Asp His Val Phe Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Phe Leu Asn Gly Gln Arg  
 405 410 415

Ala Gly Pro Val Ala Thr Tyr Phe Gln Thr Ala Leu Ala Arg Lys Asn  
 420 425 430

Phe Val Tyr Arg Asp Asn Val Leu Val Thr Gln Val Ile Arg Asn Gly  
 435 440 445

Ser Thr Ile Thr Gly Val Arg Thr Asn Asp Leu Thr Ile Gly Pro Asp  
 450 455 460

Gly Ile Val Pro Leu Asn Pro Asn Gly Arg Val Ile Leu Ala Gly Gly

465

470

475

480

Ser Phe Gly Thr Pro Arg Ile Leu Phe Gln Ser Gly Ile Gly Pro Thr

485

490

495

Asp Met Leu Gln Val Val Gln Gly Asn Ala Gln Ala Ala Ala Asn Leu

500

505

510

Pro Pro Gln Asn Gln Trp Ile Asn Leu Pro Val Gly Gln Ala Val Ser

515

520

525

Asp Asn Pro Ser Ile Asn Leu Val Phe Thr His Pro Ser Ile Asp Ala

530

535

540

Tyr Asp Asn Trp Ala Thr Val Trp Ser Asn Pro Arg Gln Ala Asp Ala

545

550

555

560

Gln Gln Tyr Leu Gln Ser Arg Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Pro

565

570

575

Lys Leu Asn Phe Trp Arg Ala Tyr Gly Gly Ser Asp Gly Ile Thr Arg

580

585

590

Tyr Ala Gln Gly Thr Val Arg Pro Gly Ala Ala Ser Val Asn Thr Ser

595

600

605

Val Ala Tyr Asn Ala Ser Gln Ile Phe Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Ser

610

615

620

Asn Gly Ile Gln Ser Arg Gly Arg Ile Gly Val Asp Ala Ala Leu Asn  
625 630 635 640

Ala Lys Ala Leu Val Asn Pro Trp Leu Thr Asn Ala Val Asp Lys Thr  
645 650 655

Ile Leu Leu Gln Ala Leu His Asp Val Val Ser Thr Leu Asn Asn Val  
660 665 670

Gln Gly Leu Thr Met Ile Thr Pro Asp His Thr Met Thr Ile Glu Gln  
675 680 685

Tyr Val Asp Ala Tyr Asp Pro Ala Thr Met Cys Ser Asn His Trp Val  
690 695 700

Gly Ala Ala Lys Ile Gly Thr Ser Pro Ser Thr Ala Val Val Asp Glu  
705 710 715 720

Asn Ala Lys Val Phe Asn Thr Asp Asn Leu Phe Ile Val Asp Ala Ser  
725 730 735

Ile Ile Pro Ser Leu Pro Val Gly Asn Pro Gln Gly Leu Leu Met Ser  
740 745 750

Ala Ala Glu Gln Ala Val Ser Lys Ile Leu Ala Leu Ala Gly Gly Pro  
755 760 765



<210> 2

<211> 768

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 2

Met Lys Leu Lys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Pro Leu Val Gly Ser  
1 5 10 15

Val Tyr Pro Gln Val Ala Ala Pro Tyr Gln Asp Ala Gly Asn Gly Phe  
20 25 30

Val Phe Asp Gly Val Thr Asp Pro Val His Ser Val Thr Tyr Gly Ile  
35 40 45

Val Leu Pro Gln Ala Ala Ser Ser Ser Glu Phe Ile Gly Glu Ile Val  
50 55 60

Ala Pro Asn Asp Ala Gln Trp Ile Gly Leu Ala Leu Gly Gly Ala Met  
65 70 75 80

Ile Gly Asp Leu Leu Leu Val Ala Trp Pro Tyr Glu Asn Lys Ile Ile  
85 90 95

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Pro Ala Val Tyr Asp  
100 105 110

Gly Pro Thr Ile Thr Thr Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn Ser Thr His  
115 120 125

Trp Lys Phe Val Phe Arg Cys Gln Asn Cys Thr Ser Trp Asp Gly Gly  
130 135 140

Ser Ile Asp Pro Ser Gly Thr Gly Val Phe Ala Trp Ala Tyr Ser Asn  
145 150 155 160

Val Ala Val Asp Thr Pro Ala Asp Pro Asn Ser Ser Phe Ala Glu His  
165 170 175

Thr Asp Phe Gly Phe Phe Gly Val Asn Phe Pro Asp Ala Gln Asn Ser  
180 185 190

Asn Tyr Gln Asn Tyr Leu Gln Gly Asn Ala Gly Thr Pro Pro Pro Thr  
195 200 205

Ser Val Pro Ser Gly Pro Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Gly Pro Thr  
210 215 220

Ala Thr Ala Thr Pro Phe Asp Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Pro Gly  
225 230 235 240

Gly Leu Ile Ala Ala Asp Arg Leu Ser Glu Ala Gly Lys Lys Val Leu  
245 250 255

Leu Leu Glu Arg Gly Gly Pro Ser Thr Ala Glu Thr Gly Gly Thr Tyr  
260 265 270

Asp Ala Pro Trp Ala Lys Ser Ala Asn Leu Thr Lys Phe Asp Val Pro  
275 280 285

Gly Leu Phe Glu Thr Leu Phe Thr Asp Thr Asn Pro Phe Trp Trp Cys  
290 295 300

Lys Asp Thr Asn Phe Phe Ala Gly Cys Ile Leu Gly Gly Gly Thr Thr  
305 310 315 320

Val Asn Gly Ala Leu Tyr Trp Tyr Pro Asn Asn Asn Asp Phe Ser Thr  
325 330 335

Ala Ser Gly Trp Pro Ser Ser Trp Ala Asn His Gln Pro Phe Thr Ser  
340 345 350

Lys Leu Lys Gln Arg Leu Pro Ser Thr Asp His Pro Ser Thr Asp Gly  
355 360 365

Gln Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Asn Val Val Gln Gln Leu Leu Gln  
370 375 380

Ser Gln Gly Tyr Arg Gln Val Thr Ile Asn Asp Asp Pro Asp Ser Lys  
385 390 395 400

Asp His Val Phe Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Phe Leu Asn Gly Gln Arg  
405 410 415

Ala Gly Pro Val Ala Thr Tyr Phe Gln Thr Ala Leu Ala Arg Lys Asn

420

425

430

Phe Val Tyr Arg Asp Asn Val Leu Val Thr Gln Val Ile Arg Asn Gly

435

440

445

Ser Thr Ile Thr Gly Val Arg Thr Asn Asp Leu Thr Ile Gly Pro Asp

450

455

460

Gly Ile Val Pro Leu Asn Pro Asn Gly Arg Val Ile Leu Ala Gly Gly

465

470

475

480

Ser Phe Gly Thr Pro Arg Ile Leu Phe Gln Ser Gly Ile Gly Pro Thr

485

490

495

Asp Met Leu Gln Val Val Gln Gly Asn Ala Gln Ala Ala Ala Asn Leu

500

505

510

Pro Pro Gln Ser Gln Trp Ile Asp Leu Pro Val Gly Gln Ala Val Ser

515

520

525

Asp Asn Pro Ser Ile Asn Leu Val Phe Thr His Pro Ser Ile Asp Ala

530

535

540

Tyr Asp Asn Trp Ala Thr Val Trp Ser Asn Pro Arg Gln Ala Asp Ala

545

550

555

560

Gln Gln Tyr Leu Gln Ser Arg Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Pro

565

570

575

Lys Leu Asn Phe Trp Arg Ala Tyr Gly Gly Ser Asp Gly Ile Thr Arg  
580 585 590

Tyr Ala Gln Gly Thr Val Arg Pro Gly Ala Ala Ser Val Asn Thr Ser  
595 600 605

Val Ala Tyr Asn Ala Ser Gln Ile Phe Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Ser  
610 615 620

Asn Gly Ile Gln Ser Arg Gly Arg Ile Gly Val Asp Ala Ala Leu Asn  
625 630 635 640

Ala Lys Ala Leu Val Asn Pro Trp Leu Thr Asn Ala Val Asp Lys Thr  
645 650 655

Ile Leu Leu Gln Ala Leu His Asp Val Val Ser Thr Leu Asn Asn Val  
660 665 670

Gln Gly Leu Thr Met Ile Thr Pro Asp His Thr Met Thr Ile Glu Gln  
675 680 685

Tyr Val Asp Ala Tyr Asp Pro Ala Thr Met Cys Ser Asn His Trp Val  
690 695 700

Gly Ala Ala Lys Ile Gly Thr Ser Pro Ser Thr Ala Val Val Asp Glu  
705 710 715 720

Asn Ala Lys Val Phe Asn Thr Asp Asn Leu Phe Ile Val Asp Ala Ser  
725 730 735

Ile Ile Pro Ser Leu Pro Val Gly Asn Pro Gln Gly Leu Leu Met Ser

740

745

750

Ala Ala Glu Gln Ala Val Ser Lys Ile Leu Ala Leu Ala Gly Gly Pro

755

760

765

<210> 3

<211> 3420

<212> DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 3

catgtcctgt cggtccttg aatgctcggg tctttctcgc gataccgaag tgctgggcaa 60  
cccggggacg cgtataaagt ccaaaaaatc ggtctttgac ggtgagcgcg acactacgac 120  
tgccccccat gaagttcaag agtctcctgt tgtccgtgtt gccgttggtc ggctctggta 180  
tgttgccggc ttccatccga caccgagacg agacgctgac agtaacacgc caccgaccagt 240  
ctactcccag gtcgccgcac cctaccagga cgccggcaac ggcttcgtct ttgacgggtgt 300  
cactgatcca gtgcatagcg tcacgtatgg aatcgtcctc cctcaggcgg cctccagctc 360  
ggagttcatt ggcgagatcg tcgcgccaaa cgacgcacaa tggatcgggtt tggctcttgg 420  
aggagccatg atcggcgacc tgcttctcgt cgcatggcca tatgagaaca aaattatitt 480  
ctccccctgc tacgcgacgt gagtatatgc tgttacatgt atgcagacgc tacgggctaa 540  
atagccaat ctcacagcgg gtacacgctg ccggcgggtct acgaaggccc aaccattacc 600  
acactcccgt ccagttcgat caactcgacg cactggaagt tcgtgttccg ctgccagaac 660  
tgcacatgtg cgtacctcac attacgtatg acgtctccaa ctaaacctct tcacagcctg 720  
ggatggcgga agcattgacc cctccggcac tggcgtcttc gcgtgggcgt actcgaacgt 780  
cgcagtagat acccccgcgc atcccaacag cagcttcgcc gagcacaccg actgtaagcg 840  
atcatctctg aacctggta ctgaatcact catggtatat cgcagtcggc ttcttcggcg 900

tcaacttccc cgatgctcag aactcgaact accaaagcta cctccagggc aacgccggca 960  
 ctccccctcc cacatccgtc cctagcggcc cticcagcac tacgactact actggtccta 1020  
 cggcaaccgt gagggcttcc acttcgctgt gcaggacgtt gctaacggtc tgtacaggct 1080  
 acgccgtttg actacatcgt cgttgggtgcc ggcccagggtg gtctcatcgc tgccgatcgc 1140  
 ttgtcggagg cgggcaagaa ggtccttctt cttgagcgtg gtggaccttc gactgcagag 1200  
 accggcggca cttacgatgt cccatgggccc aagtccgcta acgtgagttg aatacccttg 1260  
 aatcgataat gcgcacaccg actgactccc atccatggta gctcacaaaa ttcgatgtcc 1320  
 cgggattgtt cgagacgctg ttcaccgaca cgaaccatt ctgggtgggtc aagggtgggt 1380  
 cggtttctgg aagcgcattgt caacgtcgtt aagaaagcct tctagacacc aacttctttg 1440  
 ctggatgcat tctcgggtggc ggtaccacgg tcaacggagc gtaagtgcatt tgactctgcc 1500  
 gtgccaagc agccctcctg acgacaatct acagtcttta ctggtacccc aacaacaatg 1560  
 acttctccac cgccagcggg tggccgagca gctggaccaa ccaccagccg ttcaccaaca 1620  
 agctgaagca gcgtctgccg agcacagacc acccctccac cgacggccag cgctacctcg 1680  
 aacagtccgc gaacgtcgtc cagcagctgc tccagagcca gggctaccgg caggtcacga 1740  
 tcaacgacga cccggactcc aaggaccacg tcttcggcta cagcgcgttt gacttcctca 1800  
 acgggcagcg cgccggtccc gtcgcgacgt acttccagac cgcgctcgcg cgcaagaact 1860  
 tcgtgtaccg cgacaacgtg ctcgtcacgc aggtcatccg caacggctcg acgatcacgg 1920  
 gcgtgcgcac gaacgacctc accatcgggc ccgacggcat cgtgcccctc aaccggaacg 1980  
 gccgcgtcat ccttgctggc ggctcgttcg ggaccccgcg catcctgttc caaagcggca 2040  
 tcgggcccgc ggacatgctc caggctcgtc agggcaacgc gcaggccgcg gcgaacctgc 2100  
 cccgcagaa ccagtggatc aacctccgg tcggccaggc cgtgtctgac aacctgtcga 2160  
 tcaacgtgag tgacgtgca tacgcgttca agcccgcgg cctgaggctg acatggctcg 2220  
 tagttggtct tcaactaccc gagcatcgc gcgtacgaca actgggagc cgtatggctg 2280  
 aaccaaggc aggcggacgc tcagcagtac ctgcagagcc gctccggcgt gttggcgggc 2340  
 gcgtccccga agtacgttcg acatcgcgcc tggagtcttg cagggtgtctg accagtcctc 2400  
 tctacaggct gaacttctgg agggcctacg gcggcagtg cggatcacc cgctacgtat 2460  
 gtctatgttc gtcttgatct ccggtgctac gacctgacat tggccgtagg cgcaaggaa 2520  
 tgtccgtcct ggcgagcat ccgtgaacac ctccgttgcg tacaacgca gccagatctt 2580  
 cacgatcacc ctctacctgt gggtagcagc ccgaccgtat gtggactgtg cagctaaccg 2640

tgcaccacta cagggtccaac ggtatccagt cgcgcggtcg catcggcgtg gacgccgccc 2700  
 tgaacgcgaa ggcgctcgtc aacccttggc tcaccaacgc cgtcgacaag acgatcctgc 2760  
 tgcaggccct gcacgacgtc gtctccacac tgaataacgg taaggccact tctccgtacc 2820  
 tgcctgcgcg cgcgccgctc atgcctctcc ttcctccagt ccaaggcctg acgatgatca 2880  
 ccccgacca caccatgacg atcgagcagt acgtcgacgc ctacgaccg gtgagtcccg 2940  
 cccgcagcat cccggcgaaa taaaaaacgg acgtcgacgc ccccggtcca cgcaggcgac 3000  
 gatgtgctcc aaccactggg tgggcgcccgc gaagatcggc acaagcccgt ccacggccgt 3060  
 cgtcgacgag aacgcgaagg tgttcaacac ggacaacctg gtacgtttcc ctgccctttt 3120  
 tcttcccgtg ccctccgctg acgcggcctt cctgcagttc atcgtcgatg cgtccatcat 3180  
 cccgtctctg ccggtcggga acccgcaggg cctgctcatg tctgcggccg agcaggccgt 3240  
 gtcgaagatc ctgcgctcg ccggaggacc gtgaggcagg gggttcaaaa gcatttggag 3300  
 cgctgctatg gtagaccatg aagcgggatg ggtcctgtcg atatgagaca cgatgtatat 3360  
 attatatatt ctgcacgggtt ttcttcttcc tggaagcctg atgaggctct cgacgtgccca 3420

<210> 4

<211> 3480

<212> DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 4

agcgacgcg gcggtacca aatgagcgtt catgtcctgt cggctccttg aatgctcggg 60  
 tctttctcgc ggtaccgaag tgctgggcaa cccggggacg cgtataaagt ccaaaaaatg 120  
 ggtcttgaac ggtgagcacg aactacgac cgcgcccat gaagctcaag agcctcctgt 180  
 tgtccgtgtt gccgttggc ggctctggta tgttcagcc ttctatctga catcgagacg 240  
 agacgtgac agtaacgcac cacgaacagt ctacccccag gtcgccgcac cctaccagga 300  
 cgccggcaac ggcttcgtct ttgacgggtg cactgaccca gtgcatagcg tcacctatgg 360  
 aatcgtcctc cctcaggcgg cctccagctc ggagttcatt ggcgagatcg tcgcgcaaaa 420  
 cgacgcacaa tggatcgggtt tggctcttgg aggagccatg atcggcgacc tgcttctcgt 480



cgcatggcca tatgagaaca aaatcatttt ctcccctcgc tacgcgacgt gagtatatgc 540  
 tgttacatgc atgcagacgc tcggggctaa atacgccaat attacagcgg gtacaccctg 600  
 ccggcggctct acgacggccc aaccattacc acactcccgt ccagttcggg caactcgacg 660  
 cactggaagt tcgtgtttcg ctgccagaac tgcacatgtg cgtacctcac atttcgtacg 720  
 acgtctccaa ctaaacctct tcacagcctg ggatggcgga agcattgacc cctccggcac 780  
 tggcgtcttc gcgtgggcgt actcgaacgt cgcagttgat acccccgccg atcccaacag 840  
 cagcttcgcc gagcacaccg actgtaagca atcatctctt aatcccgggtg ccgaatcact 900  
 catggtatat cgcagtcggc ttcttcggcg tcaacttccc cgatgctcag aactcgaact 960  
 accaaaacta cctccagggc aacgccggca cccccctcc cagtcctgc cctagcggcc 1020  
 cttccagcac tacgactact actggtccta cggcaactgt gagcgcttcc acttcactgt 1080  
 gcagaacgtc gctaactttc tgtataggct acgccgtttg actacatcgt cgttggtgcc 1140  
 ggcccaggtg gtctcatcgc tgccgatcgc ctgtcggagg cgggcaagaa ggttcttctt 1200  
 cttgagcgtg gtggaccttc gacagcagag accggcggca cttacgatgc cccatgggcc 1260  
 aagtcgccta acgtgagttg aatacccttg aatcgataat gcgcacaccg actgactccc 1320  
 atccatggta gtcacaaaaa ttcatgtcc cgggattgtt cgagacgctg ttcaccgaca 1380  
 cgaaccatt ctggtggtgc aagggtgggt cggtttctgg aagcgcattg caacgtcgt 1440  
 gagaaagcgt tctagatacc aacttctttg ctggatgcat tctcgggtggc ggtaccacgg 1500  
 tcaacggagc gtaagtgcatt cgactctgcc gtgtccaagc agtcctccta acgacaatct 1560  
 acagtcttta ctggtacccc aacaacaatg acttctccac ggccagcggga tggccgagca 1620  
 gctgggcca aa ccaccagccg ttcaccagca agctgaagca gcgtctgccg agcacagacc 1680  
 accctccac cgacggccag cgctacctcg aacagtccgc gaacgtcgtc cagcagctgc 1740  
 ttcaaagcca gggctaccgg caggtcacga tcaacgacga cccggactcc aaggaccacg 1800  
 tcttcggcta cagcgcgttc gacttctca acgggcagcg cgccggcccc gttgcgacgt 1860  
 acttcagac cgcgctcgcg cgcaagaact tcgtgtaccg cgacaacgtg ctcgtcacgc 1920  
 aggtcatccg caacggctcg acgatcaccg gcgtgcgcac gaacgacctc accatcgggc 1980  
 ccgacggcat cgtgcccctc aaccgaacg gccgcgtcat cctcgttggc ggctcgttcg 2040  
 ggaccccgcg catcctgttc caaagcggca tcgggccgac ggacatgctc caggtcgtgc 2100  
 agggcaacgc gcaggctgcg gcgaacctgc cccgcagag ccagtggatc gacctcccg 2160  
 tcggccaggc cgtgtctgac aaccgctga tcaacgtgag tgacgtgta tacgtgctct 2220

agcccgccgg cctgaggctg acatggctcg tagttggtct tcacgcaccc gagcatcgac 2280  
 gcgtacgaca actgggccac cgtgtggtcg aaccccaggc aggcggaacgc tcagcagtat 2340  
 ctgcagagcc gctccggcgt gttggcgggc gcgtcccca agtacgttcg acatcgtgtc 2400  
 cggagtcttg cagggtgtctg accagtcctc tctacaggct gaacttctgg agggcctacg 2460  
 gcggcagtga cggcatcacc cgctacgtat gtctatgtcc gtcttcatca atggaaccgc 2520  
 gatctgacat tatccgtagg cgcaaggaac cgtccgtcct ggcgagcat ccgtgaacac 2580  
 ctccgttgcg tacaacgcga gccagatctt cacgatcacc ctctacctgt gggtaccaac 2640  
 ccggtcgtat gtataccgtg cagctgaccg tgcgccacca caggccaac ggtatccagt 2700  
 cgcgcggtcg cattggtgtg gacgccgcc tgaacgcga ggcgctcgtc aaccctggc 2760  
 tcaccaacgc cgtcgacaag acgatcctgc tgcaggccct gcacgacgtc gtctccacac 2820  
 tgaacaacgg taaggccgcc cctacatgcc cgcctgcgcg cgccgctcat gccgtcctt 2880  
 cctccagtcc aaggcctgac gatgatcacc cccgaccaca ccatgacgat cgagcagtac 2940  
 gtcgacgcct acgaccgggt gagtcccgtc cgcagcatcc ccgaaaaga aaaaaaacga 3000  
 acgctgacgc ccccggtcca cgcaggcgac gatgtgctcc aaccactggg tggcgccgc 3060  
 gaagatcggc acgagcccgt ccacggccgt cgtcgacgag aacgcgaagg tgttcaacac 3120  
 ggacaacctg gtgcgttccc cttcgttatg taactacca cctcccctgg ccaccgccgc 3180  
 tgacaggatc gacgtttctg catcgagtt catcgtcgac gcgtccatca tccgctctct 3240  
 gccggtcggg aaccgcagg ggttgcctcat gtccgcggcc gagcaggccg tgtcgaagat 3300  
 cctcgcgctc gccggaggac cgtgaggag ggggttcaaa agcctttgga gcgctgctat 3360  
 ggtggaccct gaagcgggat gggttctgtc gatatgagac acgatgtaat attatattct 3420  
 gcatgaattt cttcttctg cagcctaag cggactgtct ctcatgtgc taacgagagc 3480

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

taygaraaya avatthttt

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

catgatgtgt ggtggatg

18

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

atgaagttca agagtctcct gt

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ggtacagtac ttatctgtat

20

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

ctttactggt accccaacaa caatg

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

gttgatcgac gggttgtcag acacg

25

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

gcggccgcgt cacctccgt

19

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

gcggccgcgg gtactgtg

18

【 0 1 1 4 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

配列番号 9 : 合成 DNA

配列番号 1 0 : 合成 DNA

配列番号 1 1 : 合成 DNA

配列番号 1 2 : 合成 DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

セロピオースに本発明の酵素 CDH を作用させたときの反応の分析結果を示す図である。

【図 2】

本発明の酵素の至適 pH を示す図である。

【図 3】

本発明の酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 4】

本発明の酵素の反応至適温度を示す図である。

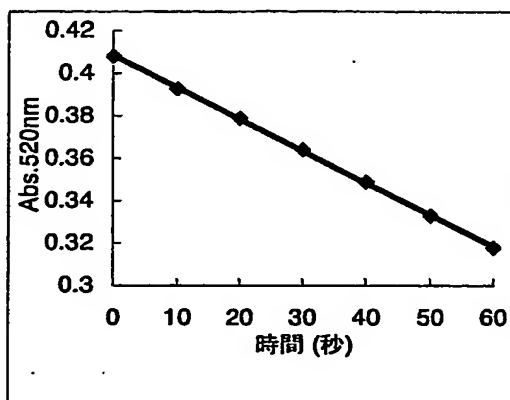
【図 5】

本発明の酵素の熱安定性を示す図である。

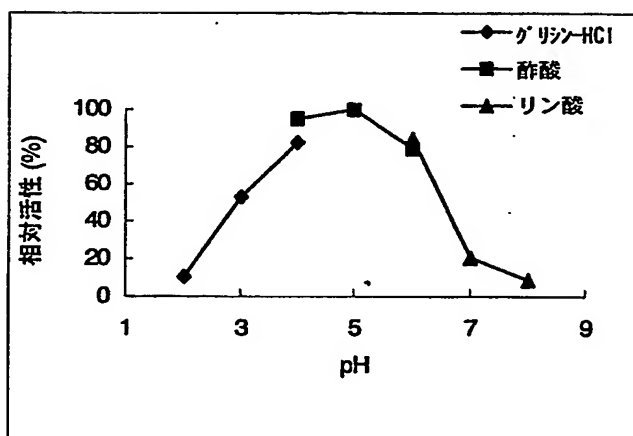
【書類名】

図面

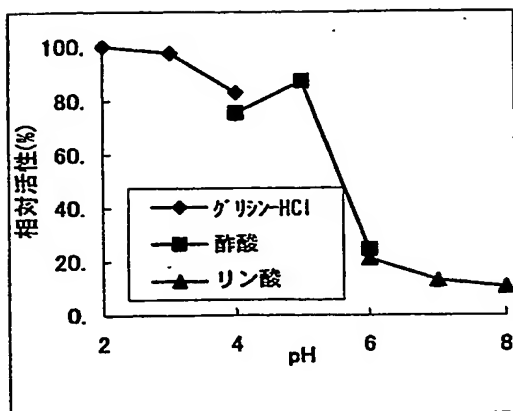
【図 1】



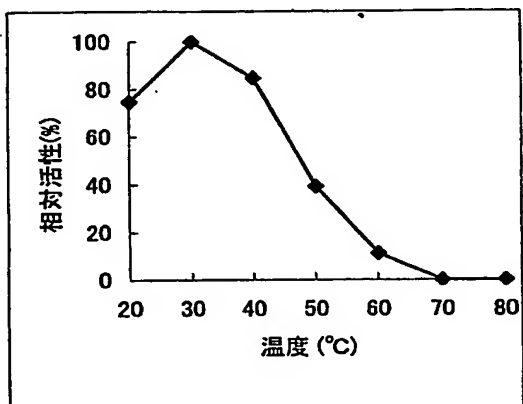
【図 2】



【図 3】

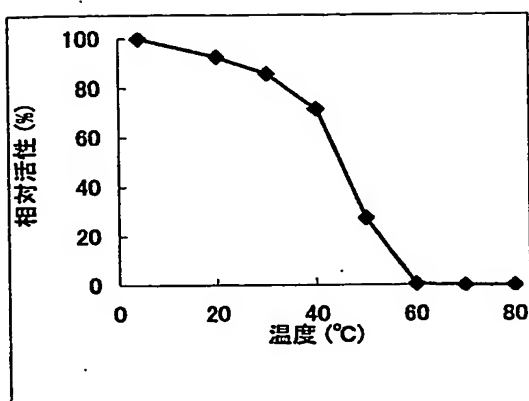


【図 4】





【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なセロビオースデヒドロゲナーゼ、該酵素をコードする遺伝子、該酵素を生産する微生物、該酵素の製造方法、並びに、該遺伝子のアンチセンス DNA 又は RNA を利用した該遺伝子の発現を制御する方法及びその用途の提供。

【解決手段】 以下の理化学的性質を有するセロビオースデヒドロゲナーゼ。

① 作用：セロビオースを酸化してセロビオノラクトンを生成する。② 基質特異性：セロビオース、セロオリゴ糖の他、セルロースを含有するアビセル、広葉樹クラフトパルプに作用する。③ 至適 pH 及び安定 pH 範囲：反応の至適 pH 範囲は pH 2～6 であり、安定 pH 範囲は 2～5 である。④ 作用適温の範囲：20～40℃の範囲にある。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000122298]

1. 変更年月日

1996年10月21日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都中央区銀座4丁目7番5号

氏 名

王子製紙株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**